

Humanes β -Defensin 1
Charakterisierung eines endogenen Peptidantibiotikums

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Jörg Grabowsky

geboren am 03.02.1962 in Kiel

1999

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto

Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. Wolf-Georg Forssmann

Tag der Promotion: 02. November 1999

Datum der Veröffentlichung: Dezember 1999

*Meiner Familie
und meinen Freunden gewidmet*

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Mai 1997 bis Oktober 1999

am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung GmbH, Hannover,

unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. Wolf-Georg Forssmann angefertigt.

An dieser Stelle sei all denen herzlich gedankt, die mir bei dieser Arbeit mit ihren Fertigkeiten und Kenntnissen zur Seite standen.

Herrn **Prof. Dr. Dr.h.c. Wolf-Georg Forssmann** danke ich für die Überlassung des Themas, die sorgfältige Betreuung und die exzellenten Möglichkeiten, diese Arbeit am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung durchzuführen. Besonders das entgegengebrachte Vertrauen und die Übernahme der kritischen Begutachtung meiner Arbeit möchte ich hervorheben.

Herrn **Prof. Dr. Bernd Otto** vom Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover, für die freundliche Übernahme des Referates.

Meinem Abteilungsleiter, Herrn **PD Dr. Markus Meyer**, für stete Ansprechbarkeit und Rückenstärkung.

Herrn **Dr. Ludger Ständker** für sein persönliches und fachliches Engagement sowie die Übernahme des Lektorates dieses Manuskriptes.

Den Herren Abteilungsleitern **Dr. Knut Adermann**, **PD Dr. Peter Schulz-Knappe**, **Dr. Manfred Raida** und **Dr. Hans-Jürgen Mägert** für die fruchtbare interdisziplinäre Hilfestellung auf allen Gebieten der Peptidchemie und der Molekularbiologie.

Für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Untersuchung humanen Gewebes und der Zusammenstellung der Patientendaten Herrn **Dr. Ulf Forssmann** und Herrn **Dr. Helmuth Goecke** vom Institut für Transplantations- und Viszeralchirurgie des Insel-Spitals, Bern, Schweiz.

Herrn **Dr. Hans-Dieter Zucht** bin ich zu besonderem Dank für die exzellente Unterstützung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und vielen guten Ideen verpflichtet.

Allen Mitarbeitern des Institutes gilt mein Dank für ihre kollegiale Hilfe im praktischen Laborbetrieb.

Besonders erwähnen möchte ich Frau **Dr. Aleksandra Heitland**, Frau **Dr. Cornelia Liepke**, Herrn **Roland Sperling**, Frau **Melanie Klingenberg** und Herrn **Wolfgang Posselt** für die kompetente Vermittlung und Einbringung ihrer wertvollen spezifischen Fertigkeiten.

Für die materielle Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit sei an dieser Stelle der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn und der Mukoviszidose e.V., Bonn gedankt.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich mit sehr großem Einsatz und Verständnis während der Arbeit an dieser Dissertation unterstützt haben.

Tierversuche

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche fanden unter Beachtung des Tierschutzgesetzes statt. Versuchsgenehmigungen seitens der Bezirksregierung Hannover lagen vor (Genehmigungen Nr. TS 509-42502-98/17 und Nr. TS 509-42502-96/908).

Förderungen

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell gefördert (Projekt BE/1799-1).

Kooperationen

Teile dieser Arbeit wurden in enger Kooperation mit folgenden Arbeitsgruppen durchgeführt:

Herrn Dr. Ulf Forssmann und Herrn Dr. Helmuth Goecke

Department of Visceral and Transplantation Surgery

Insel-Spital, University of Bern

CH-3010 Bern, Switzerland

Publikationen

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

H.D. Zucht, J. Grabowsky, M. Schrader, C. Liepke, M. Jürgens, P. Schulz-Knappe, W.G. Forssmann (1998). Human- β -defensin-1: A Urinary Peptide Present in Variant Molecular Forms and Its Putative Functional Implication. Eur J Med Res 3 (7), 315-323.

Summary

Human β -defensin-1 (hBD-1), belonging to the antibiotic peptide family of the defensins, was first isolated from human blood filtrate by our group. Further studies elucidate the significance of this peptide in the human urogenital and gastrointestinal tract. Functional characterization of hBD-1 was carried out with native material purified from human body fluids, namely blood filtrate and urine. Several different N-terminally truncated variants derived from the 68-amino acid-containing precursor of hBD-1 occur in blood filtrate and in urine. Generation of these variants can be explained by digestion through a chymotrypsin-like protease.

Only few microorganisms, for example *bacilli*, are significantly inhibited by hBD-1. Moreover, antibiotic activity is suppressed in solutions containing physiological sodium chloride concentrations. Unlike the α -defensins which are structurally related peptide antibiotics, the activity profiles of the molecular hBD-1 variants show no direct correlation with the length of the N-terminus but the extent of the N-terminus modulates the bioactivity of hBD-1 in dependence on the environment, e.g. the pH. Thus the release of molecular variants from a single precursor may liberate a large number of functional defensins with individual capacities increasing the effectivity of this antimicrobial defence arsenal.

In order to identify the putative origin of hBD-1, we analyzed the occurrence of hBD-1 and the distribution of its mRNA in human secretory and epithelial tissues. We detected hBD-1 transcripts but no hBD-1 peptide in kidney tubules. In the gastrointestinal tract both the hBD-1 peptide and mRNA were found. Immunohistochemical studies located hBD-1 in the bowel and the pancreas of patients with chronic inflammatory diseases, cancer, and healthy controls. In the pancreas hBD-1 was found in acinar cells and duct epithelium, whereas in the bowel the peptide was localized in goblet cells of Lieberkühn crypts.

We assume that hBD-1 and other defensins play a pivotal role, not only in antimicrobial host defense, but also in physiological and pathological conditions of infection and inflammation. Both human defensin families, α and β , participate in the host defense at epithelial barriers in a complementary manner.

Keywords: antimicrobial peptide, peptide antibiotics, defensin

Stichwörter: Antimikrobielle Peptide, Peptidantibiotika, Defensin

SUMMARY	1
1 EINLEITUNG	5
1.1 EINFÜHRUNG UND HISTORISCHER KONTEXT	5
1.1.1 Antibiotika	5
1.1.2 Geschichtlicher Hintergrund	7
1.1.3 Entdeckung von antimikrobiellen Proteinen und Peptiden	7
1.1.4 Antimikrobielle Peptide der Säugetiere	8
1.1.5 Antimikrobielle Peptide bei nichtsäugenden Wirbeltieren	9
1.1.6 Antimikrobielle Peptide von wirbellosen Tieren und Pflanzen	9
1.1.7 Gruppen antimikrobieller Peptide in Flora und Fauna	10
1.2 DIE PEPTID-FAMILIE DER DEFENSINE	12
1.2.1 alpha-Defensine	12
1.2.2 beta-Defensine	12
1.2.3 Tertiärstruktur und Definition des Defensinmotivs	13
1.2.4 Defensin-Peptid-Gene und -Expression	15
1.2.5 Physikalische Interaktionen zwischen Defensinen und Zellmembranen	17
1.2.6 Weitere Wirkungen von antimikrobiellen Peptiden	18
1.3 GEGENWÄRTIGER STAND DER FORSCHUNG UND AUFGABENSTELLUNG	19
2 MENSCHEN UND VERSUCHSTIERE	20
2.1 PATIENTEN UND PROBANDEN	20
2.2 VERSUCHSTIERE	20
3 MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 VERWENDETE MATERIALIEN	21
3.1.1 Bakterienstämme, Zellen, Kultur- und Assaymedien	22
3.1.2 Chemikalien	23
3.1.3 Enzyme, Peptide, Antikörper	24
3.1.4 Antikörper und Reagenzien für die Immunologie	24
3.1.5 Materialien für die Molekularbiologie	25
3.1.6 Standard-Lösungen	25
3.2 ISOLIERUNG VON DEFENSINPEPTIDEN	26
3.2.1 Extraktion von Peptiden aus Hämofiltrat	26
3.2.2 Aufbereitung von Urin	27
3.2.3 Isolierung von Defensinen aus Körperflüssigkeiten im Milligramm-Maßstab	27
3.3 PEPTID-ANALYTISCHE METHODEN	29
3.3.1 Massenspektrometrie	29
3.3.2 Electrospray-Ionization Massenspektrometrie (ESI-MS)	29
3.3.3 Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) ..	30

3.3.4 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	30
3.3.5 Aminosäureanalytik (ASA)	31
3.3.6 Peptid-Sequenzierung	32
3.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.4.1 Sterilisation von Lösungen und Materialien	33
3.4.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	33
3.4.3 Fällung von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung	33
3.4.4 Agarosegelelektrophorese von DNA	34
3.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen und wässrigen Lösungen	34
3.4.6 RNA-Extraktion	35
3.4.7 Agarosegelelektrophorese von RNA	35
3.4.8 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	36
3.4.8.1 Primer/Oligonukleotide	38
3.4.8.2 cDNA-Erststrangsynthese	39
3.4.9 Sequenzierung	39
3.4.10 Herstellung von Gensonden	40
3.4.10.1 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten	40
3.4.10.2 Reinigung radioaktiv markierter DNA	41
3.4.10.3 Aktivitätsmessung	41
3.4.11 Northern-Blot-Analyse	41
3.4.11.1 Hybridisierungen	42
3.4.11.2 Autoradiographie	42
3.4.11.3 Computergestützte semiquantitative Analyse der Northern-Blots	42
3.4.12 In-situ-Hybridisierung	43
3.5 BIOASSAYS UND FUNKTIONSTEST	44
3.5.1 Proteolytische Verdauung von Defensinen	44
3.5.2 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von Defensinen	44
3.5.3 Zellkultur und WST-1-Überlebensassay	46
3.6 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	48
3.6.1 Herstellung polyklonaler Antikörper	48
3.6.2 ELISA zum Nachweis von Antikörpern	49
3.6.3 Western-Blot-Analysen	50
3.6.3.1 Extraktion der Peptide aus Zellen	51
3.6.4 Immunhistologischer Nachweis von hBD-1 in Geweben	52
3.7 STATISTIK	54
4 ERGEBNISSE	55
4.1 BETA-DEFENSIN-1 IN HUMANEN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN	55
4.1.1 Identifizierung von hBD-1 in Hämofiltrat und Urin	55
4.1.2 Molekulare Defensin-Varianten in Hämofiltrat und Urin	56
4.1.3 Molekulare α -Defensin-Varianten im Hämofiltrat	58
4.1.4 Proteasestabilität von hBD-1	58
4.1.5 Isolierung und Reinigung von nativem hBD-1	60

4.2 NACHWEIS DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT VON hBD-1	62
4.2.1 Antibiotisches Wirkungsspektrum	62
4.2.2 Inhibition der antibakteriellen Aktivität von hBD-1 durch Salz	64
4.2.3 Modulation der antibakteriellen Aktivität von hBD-1 durch den pH	65
4.3 EINFLUSS VON hBD-1 AUF HÖHERE EUKARYOTEN	66
4.4 EXPRESSION VON BETA-DEFENSIN-1-MRNA	70
4.5 LOKALISATION DER hBD-1-EXPRESSION IN DER NIERE	72
4.6 IMMUNISIERUNG ZUR HERSTELLUNG VON ANTI-hBD-1-ANTIKÖRPERN	73
4.7 IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON BETA-DEFENSIN-1 IN HUMANEM GEWEBE	76
4.7.1 hBD-1-Peptid in Niere und Leber	76
4.7.2 hBD-1-Peptid in der Bauchspeicheldrüse	76
4.7.3 hBD-1-Peptid im Dickdarm	78
4.8 EXPRESSION DES hBD-1-GENS IM PANKREASGEWEBE VERSCHIEDENER PATIENTEN	83
5 DISKUSSION	85
5.1 ALLGEMEINES	85
5.2 DIVERSIFIKATION VON DEFENSINEN DURCH N-TERMINALE VARIATION	87
5.3 URSPRUNG DES hBD-1-PEPTIDS	91
5.4 FUNKTIONELLE CHARAKTERISTIKA VON hBD-1	95
5.5 INTESTINALE DEFENSINE	101
5.5.1 Defensine im Pankreas	102
5.5.2 Defensine im Darm	104
5.6 DEFENSINE: ENDOGENE PEPTIDANTIBIOTIKA ALS IMMUNMODULATOREN	107
5.7 EPILOG	110
6 ZUSAMMENFASSUNG	111
7 LITERATURVERZEICHNIS	113
ANLAGEN	

1.0 Einleitung

Gegenstand dieser Dissertation ist die Lokalisierung und Charakterisierung von humanem β -Defensin-1 (hBD-1). hBD-1, ein aus humanem Blutfiltrat isoliertes antimikrobielles Peptid mit Homologie zu bovinen β -Defensinen [Bensch *et al.*, 1995], ist ein endogenes Peptidantibiotikum aus der Defensin-Familie, das dem ursprünglichen, unspezifischen Immunsystem zugerechnet wird.

1.1 Einführung und historischer Kontext

1.1.1 Antibiotika

Krankheitserregende Mikroorganismen sind eine ernsthafte Bedrohung für die Gesundheit aller höheren Organismen. Die initiale Interaktion zwischen pathogenen Mikroben und höheren Eukaryoten erfolgt gewöhnlich an epithelialen Oberflächen. Hier adherieren die Mikroben und, wenn sie überleben, vermehren sie sich am Invasionsort oder dringen in tiefere Gewebeschichten und die Blutzirkulation ein. Die Mobilisierung einer pathogenspezifischen Immunabwehr mit der Bildung von komplexen Proteinen wie den Immunglobulinen ist im Verhältnis zur Kinetik der mikrobiellen Proliferation ein langsamer Vorgang. So war es unumgänglich, dass Eukaryoten weitere Verteidigungsstrategien entwickelt haben, die speziell in der frühen Phase einer Invasion von potentiell pathogenen Mikroorganismen wirksam sind. Hierzu gehört einerseits die Bereitstellung von relativ einfachen anorganischen Molekülen wie Stickoxiden (NO_x) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie andererseits die Synthese von kleinen organischen Molekülen, den Antibiotika.

Antibiotika gehören mit den Desinfizientia, Antiseptica und Sterilisantia zu den aetiotropen Mitteln, die sich gegen „lebendige“ Ursachen (Bakterien, Pilze, Protozoen und Metazoen) von Krankheiten richten. Diese Definition der Krankheitsursachen geht auf historische Vorstellungen zurück, nach denen die Erreger immer von außen kamen und lebendig waren. Bei den Babyloniern war dies ein Wurm, im Mittelalter ein böser Geist. Ursprünglich verstand man unter Antibiotika (Hemmstoffe) nur von Mikroorganismen

produzierte Substanzen, die bestimmte andere Mikroorganismenarten in ihrer Entwicklung hemmen, sie schädigen oder töten. Von anderen Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen mit Hemmwirkung (Ethylalkohol, Milchsäure) unterscheiden sich die Antibiotika, indem sie bereits in viel geringeren Konzentrationen wirksam sind und durch ihre spezifische Wirkung. Charakteristische Merkmale von Antibiotika sind ihr Wirkungsspektrum, d.h. bestimmte Antibiotika hemmen das Wachstum verschiedener Mikroorganismenarten in unterschiedlichem Maße, und dass sie auf die erzeugende Mikroorganismenart selbst nicht einwirken. Diese Definitionen wurden in heutiger Zeit präzisiert.

Im weiteren Sinne werden zu den Antibiotika auch Stoffwechselprodukte von Pilzen, Pflanzen und Tieren gerechnet. Mykotoxine, z.B. Nivalenol und Penicillinsäure, sind gewöhnlich niedermolekulare Substanzen, die vorwiegend von niederen Pilzen gebildet werden. Sie kommen gemeinhin in verschimmelten pflanzlichen Lebensmitteln vor und können bei Menschen und Tieren zu schweren Lebensmittelvergiftungen führen. Aflatoxine, von bestimmten *Aspergillus*-Stämmen gebildete Difuran-Cumarin-Derivate, gehören zu den stärksten natürlichen Zellgiften. Teilweise wirken diese Pilzgifte auch auf andere Mikroorganismenarten, so dass eine Abgrenzung zu den Antibiotika nicht immer eindeutig ist. Viele Pflanzen enthalten antibiotisch wirksame Stoffwechselprodukte, sogenannte Phytonzide. Hierzu zählen z.B. in Zwiebelgewächsen und Senfkörnern enthaltene Senföle, ätherische Öle vieler Gewürzarten wie Nelkenöl aus Gewürznelken oder Fenchelöl, das in Pfefferkörnern enthaltene Alkaloid Piperidin und Eugenol, ein Terpen-Alkohol aus Muskatnuss, Zimt und Piment. Höhere Organismen, sowohl Tiere als auch Pflanzen, produzieren zudem eine Reihe von Proteinen und Peptiden mit antimikrobiellem Potential und erweitern so die Palette der Antibiotika.

Die tierischen Peptidantibiotika unterscheiden sich von den „klassischen“ Antibiotika der Mikroorganismen in mehrerer Hinsicht [Boman, 1995]. Alle tierischen Peptidantibiotika sind Produkte einzelner Gene und werden von speziellen Zellen als Preproproteine hergestellt. Auch wenn die tatsächlichen Prozessierungsschritte bislang weitgehend unbekannt sind, wird vermutet, dass sie, wie beim Prozessing anderer regulatorischer Peptide, über definierte Stoffwechselwege eine Umwandlung zum reifen Peptid erfahren. Diese Art der Biosynthese unterscheidet sich konzeptionell von der konventioneller Antibiotika. Als Beispiel sei hier Gramacidin oder Penicillin (Bakterien und Pilze) genannt, welche durch unterschiedliche Enzyme aus einzelnen Aminosäuren

sequenziell zusammengesetzt werden. Auch funktionell unterscheiden sich Antibiotika von Mikroben und höheren Organismen. Während die Ersteren häufig als sekundäre Stoffwechselprodukte bezeichnet werden, weil deren Nutzen für den Produzenten primär nicht ersichtlich ist [Sahl & Pulverer, 1988], werden die tierischen Peptidantibiotika dem angeborenen Immunsystem zugeordnet.

1.1.2 Geschichtlicher Hintergrund

Die Erforschung von Protein- und Peptidantibiotika begann im späten neunzehnten Jahrhundert. 1879 folgerte Paul Ehrlich aus seinen Untersuchungen über die Eigenschaften von Blutzellen, dass eosinophile Granulozyten basische Proteine beinhalten und die Granula der Neutrophilen aus einer Mischung von basischen und sauren Proteinen bestehen. Metchnikov beschrieb 1883 die Überlegenheit von Phagozyten einschließlich der Neutrophilen (Mikrophagen) in der Verteidigung des Wirtes gegen Mikroben. Kanthack & Hardy entdeckten 1895, dass die Phagozytose von Bakterien zu einer Degranulation von Granulozyten führt. Schon 1905 schrieb Petterson die antimikrobielle Aktivität von wässrigen Extrakten aus Eiter basischen Proteinen zu, die er im Eiter fand.

1.1.3 Entdeckung von antimikrobiellen Proteinen und Peptiden

Erst in den 60iger Jahren unseres Jahrhunderts wurden die Erkenntnisse über Protein-/Peptidantibiotika durch neue Methoden in der Zellbiologie und der Proteinchemie erweitert. Spitznagel & Chi zeigten 1963 mit histochemischen Methoden, dass die zytoplasmatischen Granula von Meerschweinchenneutrophilen kationische, argininreiche Proteine enthalten. In den Folgejahren konnten Zeya & Spitznagel (1963-69) die Existenz von kationischen, antimikrobiellen und proteinreichen Granula in Neutrophilen von Meerschweinchen, Kaninchen, Menschen und anderen Spezies nachweisen. Zudem zeigten sie, dass Meerschweinchenneutrophile mehrere verschiedene kationische antimikrobielle Proteine enthielten. Die Aminosäureanalyse dieser Proteine ergab einen Cystein- und Arginingehalt von 3,5 % bzw. 25 %, Eigenschaften, die sie klar von Histonen, kationische Proteine des eukaryotischen Zellkerns, die unter physiologischen Bedingungen elektrostatisch an DNA binden und ebenfalls antimikrobielle Wirkungen entfalten, unterscheiden. So war es

in den frühen 70er Jahren klar, dass Neutrophilengranula bis dahin unbekannte kationische Peptide bzw. Proteine mit antimikrobiellem Potential enthielten.

In den folgenden 20 Jahren wurden mehr und mehr dieser Substanzen isoliert und charakterisiert. Unabhängig voneinander entdeckten zwei Arbeitsgruppen in humanen Neutrophilen ein Protein, dass sie „Bakterien Permeabilisierung Induzierenden Faktor“ (BPI) bzw. „kationisches antimikrobielles Protein“ (CAP57) nannten [Weiss *et al.*, 1978, Pereira *et al.*, 1990]. Die Arbeitsgruppe um Shafer (1984) beschrieb ein weiteres antimikrobielles Protein, CAP37 oder auch Azurocidin. BPI/CAP57 und CAP37/Azurocidin sind kationisch und hydrophob und haben Molekulargewichte von 57 bzw. 37 kDa. Scocchi und Mitarbeiter (1993/94) entdeckten zwei antimikrobielle, prolin- und argininreiche Proteine, Bac7 und Bac5 (Bactenicine) sowie ein weiteres Protein mit 87 % Homologie zu CAP37 in Extrakten aus den Granula von bovinen polymorphkernigen Zellen. Phagozyten produzieren aber nicht nur antibakterielle Proteine wie BPI, CAP oder auch Lysozym und Cathepsin G [Spitznagel, 1990]. Im Gegenteil, Ganz und Mitarbeiter (1985) zeigten, dass Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht (<10 kDa) ca. 30-50 % der kationischen antimikrobiellen Wirkstoffe in azurophilen Granula ausmachen. Sie gaben diesen Molekülen die Bezeichnung **DEFENSINE**. Defensine sind kationische, relativ argininreiche, nichtglykolisierte Peptide mit einem charakteristischen Cysteinmotiv und drei intramolekularen Schwefelbrücken [Selsted & Harwig, 1989]. Auf diese bei den Mammaliern dominierende Familie von Peptidantibiotika wird weiter unten noch ausführlich eingegangen.

1.1.4 Antimikrobielle Peptide der Säugetiere

Bei Tieren sind antimikrobielle Peptide wichtige Effektoren des angeborenen Immunsystems. Diese Peptide töten mikrobielle Eindringlinge in der vordersten Verteidigungslinie. Das erworbene und spezifische Abwehrsystem mit der Produktion von Antikörpern entfaltet seine Wirkung erst später. Dieses Konzept wird unterstützt durch die Tatsache, dass Peptidantibiotika nicht nur in den Granula von Phagozyten akkumuliert sind, sondern auch in Körperflüssigkeiten freigesetzt sowie in epithelialen Geweben produziert werden. So konnte u.a. nachgewiesen werden, dass spontane Zungenverletzungen bei weidenden Rindern die Bildung eines spezifischen Peptidantibiotikums rund um die Verletzungszone stimulieren, das Peptid trägt deshalb auch die Bezeichnung LAP „Lingual Antimicrobial Peptide“ [Schönwetter *et al.*, 1995]. Alle Körperbarrieren von Säugetieren sind

mit verschiedenen antibiotischen Peptiden ausgerüstet. Beim Menschen wurden die Peptide oder ihre Transkripte in Sekreten und/oder Geweben des Urogenitaltraktes [Bensch *et al.*, 1995], des Gastrointestinaltraktes [Zhao *et al.*, 1996], der Lunge [McCray *et al.*, 1997] und der Haut [Harder *et al.*, 1997] detektiert. Murine Paneth Zellen, epitheliale Zellen der Dünndarmkrypten, sind als Syntheseorte diverser Cryptdine, den murinen Homologen der Defensine, bekannt [Eisenhauer *et al.*, 1992; Ouelette *et al.*, 1992]. Interessanterweise wurden in Neutrophilen diverser Mäusestämme keine Defensine entdeckt [Eisenhauer & Lehrer, 1992]. Auch humane Paneth Zellen bilden zwei Peptide aus der Familie der Defensine [Jones & Bevins, 1992 und 1993]. Aus Schweinedarm wurde ein prolin/argininreiches 39 AS langes Peptid, PR-39, mit antimikrobiellem Potential isoliert [Storici & Zanetti, 1993]. Es unterscheidet sich strukturell von den Defensinen, nämlich es enthält z.B. keine Cysteine und hat eine Sequenzhomologie zu Cathelin, einem vermeintlichen Cystein-Proteaseinhibitor aus Schweineleukozyten [Ritonja *et al.*, 1989]. Ein entsprechendes humanes Peptid, FALL-39, wurde 1995 von Agerberth *et al.* beschrieben.

1.1.5 Antimikrobielle Peptide bei nichtsäugenden Wirbeltieren

Das Gebiet der endogenen Antibiotika wurde noch ausgeweitet durch die Einbeziehung von antibiotischen Peptiden aus nichtsäugenden Wirbeltieren. So enthalten bei den Vögeln die den Neutrophilen äquivalenten heterophilen Zellen ebenfalls antimikrobiell wirksame Substanzen. Aus Hühnerleukozyten wurden cysteinreiche Peptide, die Gallinacine (Gal 1, 1 α , 2 oder CHP 1-3), und aus der Heterophilengranula von Truthähnen die „Turkey Heterophil Peptides“ THP 1-3 isoliert [Harwik *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1994]. Auch bei kaltblütigen Wirbeltieren spielen kationische Peptide eine wichtige Rolle in der Verteidigung gegen Mikroben. Die Beobachtung, dass Frösche bei Hautverletzungen natürlicher oder chirurgischer Art praktisch nie eine bakterielle Infektion erleiden, führte zur Entdeckung linearer α -helikaler Peptidantibiotika, der Magainine, in der Froschhaut [Zasloff, 1987].

1.1.6 Antimikrobielle Peptide von wirbellosen Tieren und Pflanzen

Invertebraten bilden eine reichhaltige Quelle für unzählige antimikrobielle Substanzen. Das Immunsystem von z.B. Insekten beschränkt sich auf eine angeborene

Immunantwort mit zellulären und humoralen Faktoren. Die zelluläre Antwort umfasst die Phagozytose und Einkapselung von Eindringlingen. Die humorale Antwort beinhaltet die schnelle Synthese einer Palette von antimikrobiellen Peptiden. Seit der Entdeckung des ersten antimikrobiellen Peptides aus Insekten [Steiner *et al.*, 1981] wurden in 22 Spezies über 100 verschiedene antimikrobielle Peptide bzw. Polypeptide entdeckt und näher beschrieben [Hetru *et al.*, 1997]. Bei Invertebraten ist die Hauptquelle von Peptidantibiotika der Hemozyt. Interessanterweise sind die meisten Peptidantibiotika nicht in der Hemolymphe von gesunden Tieren enthalten, sondern werden erst durch eine Verletzung oder den Kontakt mit Mikroben induziert [Cociancich *et al.*, 1994].

Wie weit das Prinzip der Immunabwehr durch antibiotische Peptide zurückreicht, dokumentiert die Entdeckung derartiger Substanzen in Skorpionen, die zu den wahrscheinlich ältesten Landlebewesen (Arachnidae) gezählt werden [Cociancich *et al.*, 1993]. Darüber hinaus wurde die Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen schon beim wasserlebenden, fossilen Schwertschwanz (*Limulus polyphemus*) beobachtet. Durch infektiöse Agenzien wird hier die Freisetzung von z.B. „Big Defensin“ und „Tachyplesinen“ induziert [Iwanaga *et al.*, 1994 und 1998].

Auch Pflanzen nutzen das Potential kleiner antibiotischer Peptide zur Abwehr von Bakterien und Pilzen [Garcia-Olmedo *et al.*, 1998]. So wurden z.B. in Rettich [Fant *et al.*, 1998], Spinat [Segura *et al.*, 1998], Tomatenpflanzen [Brandstadter *et al.*, 1996] und Kartoffeln [Segura *et al.*, 1999] Peptide mit fungizider und auch antibakterieller Wirkung gefunden.

1.1.7 Gruppen antimikrobieller Peptide in Flora und Fauna

Aus Flora und Fauna sind heute einige hundert antimikrobielle Peptide bekannt, und obwohl sie große strukturelle Unterschiede aufweisen, sind die meisten kationisch und amphiphil. Aufgrund ihrer Größe, der Struktur und der Aminosäurekomposition können sie in fünf Gruppen aufgeteilt werden:

1. cysteinreiche amphiphile β -Faltblatt Peptide
2. lineare amphiphile α -helikale Peptide ohne Cysteine
3. ringbildene Peptide mit einer Disulfidbrücke
4. lineare Peptide mit ein oder zwei vorherrschenden Aminosäuren
5. Peptidfragmente aus größeren Molekülen mit anderen bekannten Funktionen

Um einen Eindruck von der Vielfältigkeit endogener Peptidantibiotika zu vermitteln, listet Tabelle I einige ausgewählte Vertreter aus den genannten Peptidgruppen auf. Für einen umfassenden und detaillierten Überblick wird auf die Monographien von Bomann HG (1995) sowie Shafer WG, Ed. (1997) verwiesen.

Tabelle I: Antimikrobielle Peptide in Flora und Fauna.

Gruppe	„Sub“-Familie	Beispiele	Spezies/Quelle	Lokalisation	Antimikrobielles Spektrum
1	α -Defensine	HNP 1-4 HD 5, 6 MCP-1, 2 CRYPT 1-20 NP-3A GNCP-2	Säuger	Leukozyten Paneth Zellen Makrophagen	Bakterien (G+; G-) Pilze, Viren
1	β -Defensine	HBD-1, 2 TAP EBD BNBD 1-13 GAL 1-3 Big Defensin	Säuger, Vögel, Gliederfüßler	Epithelien Leukozyten Hämozyten	Bakterien (G+; G-) Pilze
1	Insekten-defensine	Defensin A Tenecin 1	Insekten	Hämozyten Fettkörper	Bakterien (G+)
1	Pflanzen-defensine	rs-AFP1 So-D1-7	Radieschen Spinat	Samen Blätter	Bakterien (G+; G-) Pilze
1	Protegrine	PG 1-4	Säuger	Leukozyten	Bakterien (G+; G-) Pilze, Viren
2	Magainine Cecropine	Magainin Cecropin A-D Cecropin P1	Amphibien Insekten Säuger	Epithelien Fettkörper Hämozyten Hämolymphe	Bakterien (G+; G-) Pilze, Parasiten
3	Brevinine Bactenicine	Cyclic dodeca peptide	Amphibien Säuger	Epithelien Granulozyten	Bakterien (G+; G-)
4	Catheline Indolicidine Bactenicine	CAP18 PR-39 Fall-39 Bac 5, 7 Apidaecin	Säuger Insekten	Granulozyten, Hämozyten Epithelien	Bakterien (G+; G-)
5	Laktoferrin Casein Pepsinogen	Laktoferricin Casocidin bPaAP	Säuger Amphibien	Leukozyten Muttermilch Magensaft	Bakterien (G+; G-) Pilze, Viren

Abkürzungen: HNP, human neutrophile peptide; HD, human defensin; MCP, macrophage cationic peptide (rabbit); CRYPT, Cryptdine (mouse); NP-3A, neutrophil peptide (rabbit); GNCP-2, guinea pig neutrophil cationic peptide; HBD, human beta defensin; TAP, tracheal antimicrobial peptide (bovine); EBD, enteric beta defensin (bovine); BNBD, bovine neutrophile beta defensin; GAL, Galinacine (chicken); rs-AFP1, raphanus sativus antifungal protein; So-D1-7, Spinacia oleracea Defensin; PG, protegrin; CAP, cationic antimicrobial protein; Bac, Bactenicine; bPaAP, bullfrog pepsinogen A-derived antimicrobial peptide; G+, Gram-positiv; G-, Gram-negativ.

1.2 Die Peptid-Familie der Defensine

Bei den Mammaliern sind die Peptide der Defensinfamilie die wichtigsten Komponenten bei der Bildung einer ersten "Abwehrlinie" gegen mikrobielle Infektionen. Defensine sind kleine (29 - 34 Aminosäuren, AS) nichtglykolytierte Peptide mit drei intramolekularen Disulfidbrücken [Ganz & Lehrer, 1995]. Aufgrund struktureller Eigenschaften auf Gen- und Peptidebene lassen sich bei dieser Familie zwei Subfamilien unterscheiden: die klassischen Defensine (α -Defensine) und die β -Defensine.

1.2.1 *alpha-Defensine*

α -Defensine wurden ursprünglich aus Alveolar-Makrophagen von Kaninchen isoliert [Selsted *et al.*, 1983]. Sie finden sich in den neutrophilen Granulozyten der meisten Säugetiere, wo sie 5 - 10 % der zellulären Proteine dieser Zellen repräsentieren [Ganz *et al.*, 1990]. α -Defensine reifen posttranslational durch eine aminoterminalen Prozessierung des 90 - 95 AS langen Prepropeptides zum aktiven Peptid [Valore *et al.*, 1992]. Beim Menschen sind bislang vier α -Defensine in Neutrophilen nachgewiesen worden: HNP 1, 2, 3 und 4 [Ganz *et al.*, 1985; Wilde *et al.*, 1989]. Außerdem werden zwei weitere α -Defensine (HD 5 und HD 6) in den Paneth Zellen des Dünndarmes [Jones & Bevins, 1992; Porter *et al.*, 1997] sowie in Epithelzellen des weiblichen Reproduktionstraktes gebildet [Quayle *et al.*, 1998].

1.2.2 *beta-Defensine*



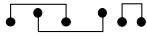
β -Defensine sind eine kürzlich entdeckte Klasse von Defensinen, die in epithelialen Geweben und Leukozyten von Vögeln und Säugern weit verbreitet ist und erstmals 1991 von Diamond *et al.* beschrieben wurde. Sie isolierten aus Epithelzellen der Luftröhre von Rindern ein den α -Defensinen ähnliches, 38 AS langes kationisches Peptid, das sie „tracheal antimicrobial peptide“ (TAP) nannten. Kurz darauf wurden aus bovinen Neutrophilen 13 ähnliche Peptide mit 38 - 42 AS, die sogenannten bovinen neutrophilen β -Defensine (BNBD) isoliert und charakterisiert [Selsted *et al.*, 1993]. β -Defensine werden als

67 - 72 AS lange Precursor-Moleküle mit einer Signalsequenz und nachfolgender Proregion synthetisiert. Im Gegensatz zu den α -Defensinen ist die posttranslationale Reifung nicht genau untersucht.

Bis heute sind zwei humane β -Defensine bekannt. hBD-1 ist als 36 AS langes Peptid aus Blutfiltrat isoliert worden [Bensch *et al.*, 1995]. hBD-2 ist ein 41 AS langes Peptid, das in Keratinozyten der Haut von Psoriasis-Patienten identifiziert wurde [Harder *et al.*, 1997].

1.2.3 Tertiärstruktur und Definition des Defensinmotivs

Das Defensinmotiv umfasst 6 konservierte Cysteine, die 3 intramolekulare Disulfidbindungen bilden. Diese für kleine Peptide zahlreichen Disulfidbrücken tragen zu einer bestimmten Fixierung der Molekülstruktur bei. Die Schwefelbrücken führen zu einer globulären, sehr stabilen Struktur mit einer komplex gefalteten tripel-helikalen β -Faltblatt Konfiguration. Alle bekannten Pflanzendefensine haben vier Disulfidbrücken und, neben drei β -Faltblattstrukturen, einen α -helikalen Bereich [Bruix *et al.*, 1993, Fant *et al.*, 1997]. Interessanterweise ähneln die Pflanzendefensine strukturell eher den Invertebraten- als den Vertebratendefensinen (Abb. 1).

Defensine unterscheiden sich in der charakteristischen Schwefelbrückenkonfiguration: α -Defensine haben die Konfiguration 1-6, 2-4, 3-5 . Dagegen haben β -Defensine die Konfiguration 1-5, 2-4, 3-6 . Diese charakteristischen Schwefelbrückenkonfigurationen unterscheiden sie von anderen biologisch wichtigen Molekülen mit intramolekularen Disulfidbindungen, z.B. der EGF/TGF- α -Familie mit einer Cystein-Bindungskonfiguration von 1-3, 2-4, 5-6  [Thim, 1989]. Die Charakteristika sind innerhalb einer Sequenz von durchschnittlich 35 AS mit ähnlichen Abständen als auch mit zusätzlichen konservierten Aminosäureresten enthalten (Abb. 2). Somit ergibt sich ein definiertes Defensinmotiv:

α -Defensine:	CXCRX3CX4EX4CX3GX5CC
β -Defensine:	CX6CX4CX7GXCX6CC

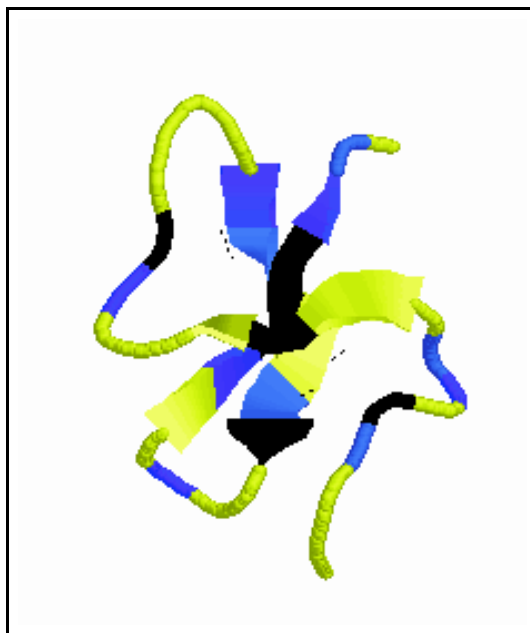


HNP-3

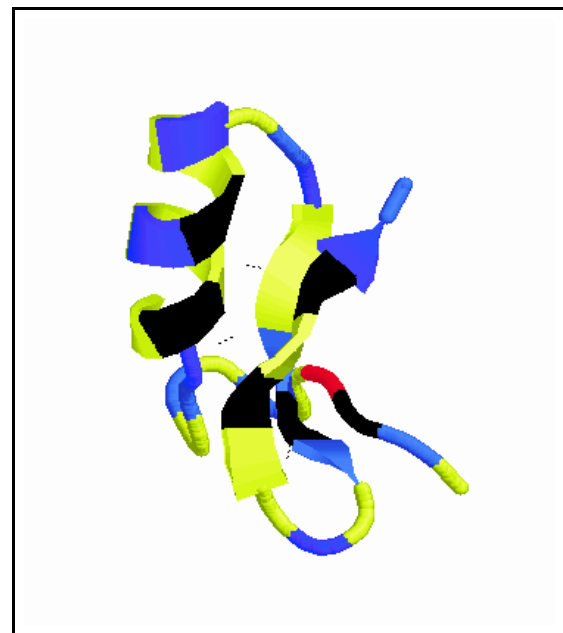


Pflanzendefensin Rs-AFP1

(Sowohl in Lösung als auch in der kristallinen Form bilden HNPs Dimere)



BNBD-12



Insektendefensin A

Abb. 1: Tertiärstrukturen von verschiedenen Defensinklassen. Alle Daten beruhen auf Kernresonanzmessungen (NMR) und wurden öffentlichen Datenbanken entnommen. Die Darstellungen wurden mittels der Software RasMol realisiert.

Gelb = hydrophobe AS, **hellblau** = polare AS, **blau** = basische AS, **rot** = saure AS, **schwarz** = Cysteine.

BNBD-12, Bovines Neutrophilen β -Defensin-12, PDB Id: 1BNB [Zimmermann *et al.*, 1995]; HNP-3, Humanes Neutrophilen Peptid-3, PDB Id: 1DFN [Hill *et al.*, 1991]; Insect Defensin A, PDB Id: 1ICA [Cornet *et al.*, 1994]; Rs-AFP1, Raphanus sativus Antifungal Protein 1. PDB Id: 1AYJ [Fant & Borremans, 1997].

β-Defensine	
hBD-1	MRTSYLLLF [*] TLC [*] LLLS [*] ---E-MAS -G GNFL-----TGL---GHR [*] S---D---HYN-----CVSSGGQCLYSACPIFTKI [*] QGT [*] CYR-G--KAK [*] CCK
hBD-2	MRVLYLLF [*] SFL [*] FIF [*] LM [*] ---PLPGVFG G-----IG-----D---PVT-----CLKSGAICH [*] PFV [*] FC [*] PRRYK [*] QIG [*] TCGLPG---TK [*] CKK [*] PK
α-Defensine	
HNP-1/2	MRTLAILLAAILLVALQAQA EPLQARADEVAA-----APEQIAAD [*] IPEVVVSLAWDES [*] LAPKHPGSRKNMAC-----YCRIPACIAGERRYGT [*] CIYQ [*] GRLWAFCC
HNP-3	MRTLAILLAAILLVALQAQA EPLQARADEVAA-----APEQIAAD [*] IPEVVVSLAWDES [*] LAPKHPGSRKNMDC-----YCRIPACIAGERRYGT [*] CIYQ [*] GRLWAFCC
HNP-4	MRIIALLAAILLVALQVRA GPLQARGDEAPG-----QEQRGPE [*] DQDIS [*] ISFAWDKSSALQVSGSTRGMVC--S--CRLVFCRRTEL [*] RVGNCLIG [*] GV [*] SFTYCC [*] TRVD
HD-5	MRTTAILLAAILLVALQAQA ESLQERADEATT-----QKQSGEDN [*] QDLA [*] ISFAGNGLSALRTSGSQARATC-----YCRTGRCATRESLSGVCEISGR [*] LYRLCC [*] RR
HD-6	MRTLITLTA [*] VLLVALQAKA EPLQAEDDPLQAKAYEADAQEORGANDQFAVSFAEDASSSLRALGSTR [*] AFTC-----HCRR-SCYSTEYSYGTCTVMGINHR [*] FCCL

Abb. 2: Aminosäuresequenzen der bekannten humanen Defensine. Die Cysteinmuster sind hervorgehoben. Konservierte Aminosäuren sind durch Sterne markiert, identische Aminosäuren innerhalb der Defensine sind jeweils durch Punkte markiert. Die vermeintlichen Signalsequenzen sind schattiert. HNP, human neutrophil peptide; hBD, human β-defensin; HD, human defensin.

1.2.4 Defensin-Peptid-Gene und -Expression

Die Gene der myeloiden α-Defensine HNP-1 bis 3, NP-3A, GNCP-2 und MCP-1, 2 bestehen aus 3 Exons und 2 Introns [Linzmeier *et al.*, 1993]. Das erste Exon codiert eine 5^l-untranslatierte Region (5^l-UTR), das zweite Exon bildet die Preprosequenz und das dritte Exon ergibt das reife Peptid sowie eine 3^l-untranslatierte Region (3^l-UTR). Bei der neutrophilen Zellreihe werden die Gene nur in unreifen Precursor-Zellen, Promyelozyten und Myelozyten exprimiert [Daher *et al.*, 1988; Nagaoka *et al.*, 1992]. Die Defensinexpression, α und β, in Makrophagen wurde nur in Alveolarmakrophagen, nicht aber in Peritonealmakrophagen beobachtet [Selsted *et al.*, 1983 und 1985; Ganz *et al.*, 1989; Linzmeier *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1998]. Im Gegensatz zu den oben genannten Peptiden werden die bovinen neutrophilen β-Defensine (BNBD-4, -12 und -13) durch 2-Exon-Gene codiert und ähneln in ihrer Genstruktur den epithelialen Defensinen (s.u.) [Yount *et al.*, 1999].

Enterale α-Defensine wie die murinen Cryptdine oder Human Defensin-5/6 und die Epithel-assoziierten β-Defensine TAP, EBD, hBD-1 und hBD-2 werden durch ein Gen aus zwei Exons, getrennt durch ein Intron, codiert [Diamond *et al.*, 1993; Huttner *et al.*, 1994; Tarver *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998]. Das erste Exon codiert die 5^l-UTR und die Preprodomäne. Exon 2 enthält den Code für das reife Peptid und eine 3^l-UTR. Einige Defensingene (TAP, hBD-2) enthalten in ihrer Promotorregion ein NFκB-Element (nuclear factor-κB), einen Genregulator für eine „Akute-Phasen-Antwort“ bei entzündlichen Prozessen

[Diamond *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1998]. Beim Menschen sind die Gene für hBD-1 und hBD-2 auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 (8p22-23.1) in unmittelbarer Nähe zu den Genen der α -Defensine lokalisiert [Sparkes *et al.*, 1989; Harder *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998]. Im Mausgenom scheinen die Genorte für α - und β -Defensine ebenfalls auf Mauschromosom 8 benachbart zu sein [Ouellette *et al.*, 1989; Huttner *et al.*, 1997]. Beim Rind befinden sich die Gene für die β -Defensine als Kluster auf Chromosom 27 [Gallagher *et al.*, 1995], beim Schaf wurde ein homologer Genlocus identifiziert [Huttner *et al.*, 1998].

Analysen der Genstrukturen der β -Defensine lassen vermuten, dass zwei Subgruppen dieser Defensinklasse existieren, die sich in Sequenzhomologie, Introngröße, Expressionsort und regulatorischen Elementen unterscheiden [Diamond & Bevins, 1998]. Die erste Gruppe ähnelt dem TAP. Die Mitglieder haben eine sehr ähnliche Nukleotid- und auch Aminosäuresequenz sowie ein kurzes (~ 2 kb) Intron. Sie werden in verschiedenen Epithelien exprimiert. Die Expression ist durch Entzündungsmediatoren induzierbar. Die zweite Gruppe umfasst hBD-1 und das murine Homolog mBD-1. Die Gene dieser Defensine haben ein sehr großes Intron (~ 10 kb), werden prinzipiell im Urogenitaltrakt exprimiert und sind durch Entzündungsmediatoren nicht induzierbar [Valore *et al.*, 1998].

Zwischen den zwei Defensinklassen α und β gibt es nur eine geringe Homologie der primären Sequenzen und doch haben sie eine sehr ähnliche Tertiärstruktur [Zimmermann *et al.*, 1995]. Sie entwickeln vergleichbare antimikrobielle Aktivitäten, werden an ähnlichen anatomischen Orten exprimiert und ihre Gene sind bei verschiedenen Spezies auf einem korrespondierenden Chromosom zusammengefasst. Einige der defensinkodierenden Gene werden konstitutiv exprimiert, während andere durch infektiöse Agenzien oder inflammatorische Mediatoren induzierbar sind. All diese Merkmale weisen auf einen gemeinsamen genetischen Ursprung der diversen Mitglieder der Defensinfamilie hin. Es ist anzunehmen, dass jedes Mitglied im Laufe der evolutionären Entwicklung individuelle Funktionen erworben hat, während einige generelle Funktionsprinzipien allen Familienmitgliedern erhalten bleiben.

1.2.5 Physikalische Interaktionen zwischen Defensinen und Zellmembranen

Bakterielle Zellwände bestehen aus 2 bis 3 Schichten: Kapsel (äußere „Membran“), Zellwand und Zell-(Plasma-)membran. Peptide der Defensin-Familie beeinträchtigen die Integrität der Zellmembran, welche im wesentlichen aus einer bilaminären Lipidschicht mit eingelassenen Proteinen besteht. Durch Störung der hydrophoben Lipid-Lipid-Interaktionen (Detergentienwirkung) wird eine der Hauptfunktionen der Membran, nämlich die Aufrechterhaltung von Ionengradienten, gestört. Voraussetzung für eine Membranzerstörung und die Bildung von Poren ist Amphiphilie, d.h. ein Molekül hat sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bestandteile. Die β -Hairpin-Struktur eines HNP-Dimers hat hydrophobe Seitenketten, während die N- und C-terminalen Enden polare Eigenschaften haben. Dies führt zu einer Struktur mit einem hydrophoben Boden und einer polaren Spitze.

Membranen von Mikroorganismen haben typischerweise ein negatives Potential. Defensine mit ihrer positiven Ladung werden deshalb durch elektrostatische Kräfte von den Membranen angezogen. Der hydrophobe Boden des Defensins bildet einen geeigneten Keil für die Penetration der Zellmembran, da die interne Membran bevorzugt hydrophob ist. Diese Eigenschaften bilden die Grundlage für die Konstruktion von Poren aus einer Kombination von mehreren ineinander verflochtenen Defensinmolekülen. Eine Studie mit *Micrococcus luteus* zeigte, dass die Porenbildung in der Zelle einen Verlust von zytoplasmatischem K^+ , eine Membrandepolarisation, eine Verminderung von zytoplasmatischem ATP und eine Inhibierung der Zellatmung verursacht. Arbeiten von Kagan *et al.* (1990) zeigten, dass Defensine bei verschiedenen Membranen mit dem selben Potential zu einer Porenformation führten, während Membranen ohne Potential keine Porenbildung zeigten. Die spannungsabhängige Porenbildung mag eine Erklärung dafür sein, dass Defensine selektiv Mikrobenmembranen und nicht körpereigene Membranen angreifen, da Mikrobenmembranen charakteristischerweise ein höheres Potential haben. Ob Defensine tatsächlich Komplexe formen und tödliche Ionenkanäle in Mikrobenmembranen bilden, bleibt zu klären.

1.2.6 Weitere Wirkungen von antimikrobiellen Peptiden

Eine offene Frage ist, ob alle antibiotischen Proteine und Peptide in erster Linie durch ihr antimikrobielles Potential dazu dienen, den Wirt in der Verteidigung gegen Mikroben zu unterstützen.

Bei einigen dieser Moleküle hat sich bereits gezeigt, dass sie auch andere als antibiotische Eigenschaften haben. BPI und CAP37 binden und neutralisieren Endotoxine [Levy *et al.*, 1995]. CAP37 und HNP-1/2 sind potente Chemotaxine für immunkompetente T-Zellen und andere Zellen der Entzündungskaskaden [Chertov *et al.*, 1996]. In nanomolaren Konzentrationen sind α -Defensine (HNP-1 und HNP-2, aber nicht HNP-3) potente spezifische Chemoattraktanten für Monozyten [Territo *et al.*, 1989]. HNP-1 bildet sehr stabile Komplexe mit α -2-Makroglobulin [Panyutich & Ganz, 1991]. Einige Defensine wirken in der Nebennierenrinde kortikostatisch [Singh *et al.*, 1988], was den Peptiden die synonyme Bezeichnung „Corticostatins“ eintrug. α -Defensine zeigen eine unspezifische, zytotoxische Aktivität gegen eine Reihe von normalen und malignen Zellen, einschließlich Zellen, die resistent gegen TNF- α und NKCF (natural killer cytotoxic factor) sind [Lehrer *et al.*, 1993]. Für HNPs konnte gezeigt werden, dass sie im Plasma von Säugern mit Serinproteaseinhibitoren (Serpine) Komplexe bilden. Diese Komplexierung inhibiert die biologischen Aktivitäten sowohl der Defensine als auch der Serpine [Panyutich *et al.*, 1995]. HNP-1 ist fähig, die hämolytische Aktivität des Komplementfaktors C1q zu inhibieren, und greift so möglicherweise direkt in das klassische Komplement-System ein, welches ein weiteres Element des Immunsystems zur unspezifischen Abwehr darstellt [van den Berg *et al.*, 1998]. Diese vielfältigen Eigenschaften von antibiotischen Peptiden deuten darauf hin, dass sie nicht nur der direkten Abwehr von Mikroben dienen, sondern auch bei der Regulation von Entzündungen, Infektionen und der Wundheilung beteiligt sein können.

1.3 Gegenwärtiger Stand der Forschung und Aufgabenstellung

Bensch und Mitarbeiter (1995) isolierten aus Blutfiltrat (Hämofiltrat) das erste humane β -Defensin, hBD-1.

Expressionsanalysen ergaben, dass hBD-1-Transkripte in nahezu allen epithelialen Geweben und sekretorischen Drüsen vorkommen, wobei Niere und Pankreas die höchsten Syntheseraten zeigten [Zhao *et al.*, 1996; Goldmann *et al.*, 1997].

Obwohl das hBD-1-Gen kloniert und seine Expression weitgehend charakterisiert wurde, konnten noch keine Zellen, die das korrespondierende Peptid enthalten, lokalisiert werden [Zhao *et al.*, 1996; Lui *et al.*, 1997].

Die Quelle der im Plasma vorkommenden Defensine ist unklar, und während es einige Erkenntnisse über die Prozessierung von α -Defensinen gibt, sind *In-vivo*-Translation und mögliche Prozessierung von hBD-1 noch unbekannt [Valore & Ganz, 1992; Nakazato *et al.*, 1995].

Das tatsächliche antimikrobielle Potential von hBD-1 sowie weitere mögliche funktionelle Charakteristika, ähnlich denen der α -Defensine, wurden bislang nicht aufgedeckt.

Defensine stellen uns vor eine Reihe von ungeklärten Fragen: Woher stammt das Peptid? Werden Defensine schnell degradiert, und wenn ja, wo findet dieser Prozess statt? Rezirkulieren Defensine oder durchqueren sie epitheliale Barrieren? Durchdringen extrazelluläre Defensine Gewebe, wie z.B. die Lunge oder den Gastrointestinaltrakt? Imprägnieren sie vielleicht Epithelzellen, basale Membranen und mukosale Gewebe?

In der vorliegenden Arbeit werden die zelluläre Lokalisation sowie individuelle funktionelle Eigenschaften von hBD-1 untersucht und „patho“-physiologische Korrelationen zu infektiös-inflammatorischen Erkrankungen betrachtet. Um Beziehungen und Kontraste in Struktur und Funktion der Subfamilien darzustellen, werden die Resultate mit ausgewählten Aspekten anderer endogener Antibiotika, insbesondere den humanen α -Defensinen, verglichen.

2.0 Menschen und Versuchstiere

2.1 Patienten und Probanden

Humane Proben von Geweben und Körperflüssigkeiten wurden bei Patienten und Probanden gesammelt. Die Einverständniserklärung (informed consent) wurde nach lokaler GLP-Vorschrift und Vorschriften der Konvention von Helsinki eingeholt. Humane Gewebe wurden aus Resektaten im Rahmen von Operationen an der Medizinischen Hochschule Hannover und am Insel-Spital, Bern, Schweiz erhalten. Hämofiltrat wurde im Rahmen der Routine-Hämofiltration von Niereninsuffizienten am Nephrologischen Zentrum Niedersachsen (Hannoversch-Münden) aus dem Routine-Arbeitsprogramm des IPF übernommen. Die Experimente stehen in Übereinstimmung mit den Richtlinien der örtlichen Ethikkommissionen und der Deklaration von Helsinki.

2.2 Versuchstiere

Für die Durchführung der Immunisierungen wurden weibliche Mäuse (NZBxNZW F1) der Firma Winkelmann, Borchen bezogen. Die Experimente stehen in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Bestimmungen des Tierschutzgesetzes und den Richtlinien des IPF.

3.0 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

<u>Gerät</u>	<u>Typ/Software</u>	<u>Hersteller</u>
Aminosäureanalyser	AminoQuant 1090, Series II HP 9000 Series 300 Data System	Hewlett Packard, Waldbronn
BioPilot	Präparative Chromatographieanlage Software BioPilot-Manager V. 2.0	Pharmacia, Freiburg
Fraktionssammler Grosslyophile HPLC	Model 2110 Fraction Collector Epsilon I/45	BioRad, München Christ, Osterode
Kontronsystem 400/322	HPLC Pumpen 420/322 HPLC Autosampler 465/360 HPLC Datasystem 450 HPLC Detector 430/742	Kontron, Neufahrn
Pilot-Scale-Anlage Waagen	Batch-Extraktionsanlage Analytik-Waage AC 120 S Laborwaage MC-1	Eigenbau, IPF, Hannover Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Biofuge 28 RS Centrikon T-142 Sigma 201 m Speedvac RC 10.10 Speedvac Univapo 150 H	Heraeus, Hanau Kontron, Henningen Heraeus, Hanau Jouan, München Uniequip, Martinsried
Inkubatoren, Rührer	Inkubationsschrank B 6120 Thermomixer 5436 Kulturschüttler Innova TM 4340 Wasserbad 1012 Magnetrührer KMO 2	Heraeus, Hanau Eppendorf, Hamburg New Brunswick, C.A., USA GFL, Burgwedel Janke & Kunkel, Staufen
Sonstiges	pH-Meter CG 804 Photometer Uvikon 940 Reinstwasseranlage Milli-Q ^{UF} plus Bioclav 3.021001 ELISA-Reader, BioTek EL 311sx Software Mikrowin Version 3.14 Gen-Amp Cyclor 2400 Photomikroskop Axiophot Kryostat Microm HM 5000M Mikrotom, Microm H 340	Kontron, Henningen Millipore, Eschborn Schütt Labortechnik, Göttingen Mikrotek, Overath Perkin-Elmer, Überlingen Carl Zeiss, Oberkochen Microm, Heidelberg Microm, Heidelberg

3.1.1 Bakterienstämme, Zellen, Kultur- und Assaymedien

Die verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien (NIH-3T3-Zellen, Mausfibroblasten; THP-1 und U-937, humane monozytäre Linien) wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellen (DSMZ) in Braunschweig bezogen und gemäß deren Anweisung kultiviert.

<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10 ^T (ATCC 6051)
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM 32 ^T (ATCC 14581)
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 348 (ATCC 9341)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 6147 (ohne)
<i>Escherichia coli</i> K12	DSM 498 (ATCC 23716)
<i>Neisseria cinerea</i>	DSM 4630 ^T (ATCC 14685)

Staphylococcus carnosus TM300 wurde von F. Goetz (Universität München), *Rhodotorula rubra* und *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) von J. Zimmer (Laborarztpraxis Hannover), *Escherichia coli* BL21 (DE3) und *Staphylococcus epidermidis* von J. Alves (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

Immortalisierte humane Nierenepithelzellen (IHKE) wurden freundlicherweise von Sven Mollerup, National Institute of Occupational Health, Oslo, Norwegen zur Verfügung gestellt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in der Regel in LB-Medium (Lauria Bertani Vollmedium). *Neisseria cinerea* wurde in TSB-Medium (Tryptic Soy Broth) angezogen. *Rhodotorula rubra* und *Saccharomyces cerevisiae* wurden in YPD-Medium (Yeast-Peptone-Dextrose) kultiviert.

LB-Medium¹	TSB-Medium²	YPD-Medium³
5 g Hefeextrakt	30 g Tryptic Soy Broth	10 g Hefeextrakt
10 g Caseinhydrolysat	3 g Hefeextrakt	20 g Pepton
5 g NaCl	ad 1 l bidest. Wasser	ad 1 l bidest. Wasser
ad 1 l bidest. Wasser		

¹Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Für Agarplatten wurden 15 g/l Agar Agar zugesetzt. ²Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH auf 7,2 eingestellt. ³Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M HCL auf 6,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 20 g/l

3 Material und Methoden

sterilfiltrierte Glukoselösung zugegeben. Alle o.g. Medien wurden im Autoklaven für 20 Minuten bei 121° C sterilisiert.

Nährmedien für die Zelllinien

NIH-3T3-Medium	THP-1 + U 937	IHKE-Medium
500 ml DMEM mit 4,5 g/l Glukose	90 % RPMI + 10 % FCS	DMEM/F12 1:1 (Endkonzentration)
2,5 ml 200 mM Glutamin	2,5 ml 200 mM Glutamin	NaHCO ₃ (1,1 g/l)
50 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56° C) Kälberserum (FCS)	1,1 ml 500x P/S	HEPES (15 mM, pH 7,3)
1,1 ml 500x Penicillin/Streptomycin (P/S)		Epidermal Growth Factor (10ng/ml)
		Insulin (5 µg/ml)
		Hydrokortison (36 ng/ml)
		Transferrin (5 µg/ml)
		Na ₂ SeO ₃ (5 ng/ml)
		Penicillin (100 U/ml)
		Streptomycin (100 U/ml)
		FCS (1 %)

Serumfreie Medien wie oben, aber ohne Zugabe von FCS.

3.1.2 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma, Deisenhofen und Serva, Heidelberg bezogen. Die Bezugsquelle richtete sich nach dem jeweils aktuellen Preisangebot. Die Chemikalien entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad *pro analysi*. Die Lösungsmittel für die Chromatographie wurden von der Firma J.T. Baker, Deventer, NL mit dem Reinheitsgrad „prepsolv“ oder „gradient grade“ bezogen. Helium, reinst zur Entgasung von Puffern, stammte von Linde, München.

3.1.3 Enzyme, Peptide, Antikörper

Trypsin aus Rinderpankreas (E.C. 3.4.21.50, modifiziert, sequencing grade), Chymotrypsin aus Rinderpankreas (E.C. 3.4.21.1, sequencing grade) und Subtilisin aus *Bacillus subtilis*, (E.C. 3.4.21.149) wurden von Boehringer, Mannheim bezogen.

Magainin-II	Bachem, Heidelberg
HNP-2	Sigma, Deisenhofen
κ -Casein	Fluka, Buchs, CH

Die synthetischen Peptide hBD-1-(D₃₃-K₆₈) und Casocidin-I (bovines casein-a_{s2}-165-203) wurden am IPF in der Abteilung Peptidsynthese unter der Leitung von Dr. K. Adermann hergestellt.

3.1.4 Antikörper und Reagenzien für die Immunologie

DEF 3 (monoclonal Mouse Anti-Human-Defensin 1-3)	BMA, Köln
EG 2 (monoclonal Mouse Anti Human ECP/EPX)	Pharmacia Upjohn, Freiburg
POD-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Sigma, Deisenhofen
aP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (whole molecule)	Sigma, Deisenhofen
POD-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Sigma, Deisenhofen
aP-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule)	Sigma, Deisenhofen
BCIP/NBT-Substrat (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitro blue tetrazolium)	Sigma, Deisenhofen
DAB (Diaminobenzidine)	Sigma, Deisenhofen
ImmunoPure ^R TMB Substrate Kit (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)	Pierce, Rockford, USA
Roti ^R -Block	Roth, Karlsruhe
Hematoxylin, Accustain, Gill No. 1	Sigma, Deisenhofen
Kaleidoscope Polypeptide Standard	BioRad, München
Immun-Blot ^R PVDF-Membran	BioRad, München
Ready-Gel 16,5 % Tris-Tricine	BioRad, München
Giemsa-Färbelösung	Merck, Darmstadt

3.1.5 Materialien für die Molekularbiologie

Combi Polymerase	InViTek, Berlin-Buch
RNase H	Gibco BRL, Eggenstein
SuperscriptII™ Reverse Transcriptase	Gibco BRL, Eggenstein
Taq DNA Polymerase	Biomol, Hamburg
pGEM-T Vector System I	Serva, Heidelberg
Terminale Transferase	Gibco BRL, Eggenstein
Random Primed DNA Labelling Kit	Boehringer, Mannheim
Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
QIAquick GelExtraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick GelPurification Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labelling Kit	Boehringer, Mannheim

3.1.6 Standard-Lösungen

Natriumphosphatpuffer, pH 7,2:	10 mM Natriumhydrogenphosphat 10 mM Natriumdihydrogenphosphat
Tris-HCl-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 7,4
Ammoniumcarbonatpuffer:	100 mM Ammoniumhydrogenphosphat, pH 8,0
TBS(T)-Puffer:	150 mM NaCl 10 mM Tris-base, pH 8,0 (0,01 % TWEEN 20)
RNA-Lysispuffer:	4 M Guanidiniumisothiocyanat 25 mM Natriumcitrat pH 7,0 0,5 % (w/v) Sarcosin 0,7 % (w/v) β -Mercaptoethanol
50 x TAE	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 100 mM EDTA

3.2 Isolierung von Defensinpeptiden

3.2.1 Extraktion von Peptiden aus Hämofiltrat

Die Herstellung von Peptidbanken aus humanen Körperflüssigkeiten bildet am IPF die Grundlage zur Identifizierung und Isolierung von Peptiden. Auch hBD-1 wurde auf diese Weise entdeckt [Bensch *et al.*, 1995]. Im Detail ist das Verfahren der großtechnischen Präparation von zirkulierenden Peptiden von Schulz-Knappe und Mitarbeitern (1996/97) beschrieben worden.

Zur Gewinnung von Hämofiltrat wird das Blut der Patienten über einen Filter mit einer spezifischen Ausschlussgröße von 20 kDa filtriert. Das Filtrat wird gesammelt, sofort auf 4° C gekühlt und mit HCl auf pH 2,7 eingestellt, um Bakterienwachstum und Degradation der Peptide durch Proteolyse zu vermeiden. Die anschließende Peptidextraktion beginnt mit einer Bindung an Ionenaustauschmaterial und einer pH-Stufenelution. Für die pH-Stufenelution werden folgende Puffer in der aufgeführten Reihenfolge eingesetzt:

Puffer	Puffersubstanz	pH-Wert	Leitfähigkeit
Auftragspuffer:	VE-Wasser	pH= 2,42	LF= 0,10 mS
Elutionspuffer 1:	0,1 M Citronensäure-1-hydrat	pH= 3,60	LF= 2,92 mS
Elutionspuffer 2:	0,1 M HAc + 0,1 M NaAc	pH= 4,50	LF= 4,06 mS
Elutionspuffer 3:	0,1 M Äpfelsäure	pH= 5,00	LF= 6,15 mS
Elutionspuffer 4:	0,1 M Bernsteinsäure	pH= 5,60	LF= 6,10 mS
Elutionspuffer 5:	0,1 M NaH ₂ PO ₄	pH= 6,60	LF= 4,87 mS
Elutionspuffer 6:	0,1 M Na ₂ HPO ₄	pH= 7,40	LF= 6,73 mS
Elutionspuffer 7:	0,1 M Ammoniumcarbonat	pH= 9,00	LF= 6,65 mS

Die aus der Stufenelution resultierenden 7 pH-Pools werden zur Entsalzung und weiteren Fraktionierung mittels Reversed-Phase Chromatographie (RPC) weiterverarbeitet [Schulz-Knappe *et al.*, 1997]. In einem Ansatz werden routinemäßig die Peptide aus bis zu 10.000 l Hämofiltrat extrahiert und fraktioniert. Die dabei entstehende Peptidbank enthält etwa 300 Fraktionen, in denen die Peptide in einer bioaktiven, entsalzten und lyophilisierten Form vorliegen.

3.2.2 Aufbereitung von Urin

Neben der Peptidbank aus Hämofiltrat wird am IPF auch eine Peptidbank aus humanem Urin erstellt [Heine *et al.*, 1998]. Im Einzelnen wurden 10 Liter Urin von gesunden, erwachsenen Probanden (Alter: 23-58 Jahre) sofort nach der Sammlung zusammengeführt, angesäuert (pH 2,5) und bei -20° C eingefroren. Der Urin wurde mit Membranfiltern filtriert (AP20, 8µm und AA 0,8 µm, Millipore, Eschborn) und über eine Reversed-Phase Festphasenkartusche (SourceRPC) entsalzt. Das Eluat wurde, wie für Hämofiltrat beschrieben, in 7 pH-Pools aufgetrennt (Fractogel TSK SP 650 (M), 125 mm x 10 mm, Merck) und analysiert.

3.2.3 Isolierung von Defensinen aus Körperflüssigkeiten im Milligramm-Maßstab

Die präparative Reinigung der in dieser Arbeit beschriebenen Peptide wurde in der Abteilung Präparative Peptid-Chemie (IPF) durchgeführt.

Die Moleküle der Defensinfamilie haben einen hohen Grad an Sequenzhomologie und die physikalischen Eigenschaften der Peptide sind voraussehbar ebenfalls sehr ähnlich. Deshalb wurde die hohe Auflösungskraft der High Performance (Pressure) Liquid Chromatographie (HPLC) für die Entwicklung von Methoden zur Isolation und Reinigung der Defensine genutzt. Da die gereinigten antibiotischen Peptide gewöhnlich in antimikrobiellen Assays getestet werden, ist es essentiell, Artefakte (antimikrobielle) während der Aufreinigung auszuschließen. In dieser Hinsicht ist die HPLC eine vorzügliche Methode für die Herstellung hochreiner Präparationen zur Charakterisierung antimikrobieller Peptide. Aufgrund der amphipatischen Natur der Defensine empfiehlt sich zur Isolierung dieser Moleküle besonders die Reversed-Phasen-Chromatographie (RPC), bei der die Trennung polarer Verbindungen vorrangig durch hydrophobe Interaktionen zwischen mobiler Phase (Lösung) und fester Phase (Säulenmaterial) erfolgt. Im Gegensatz z.B. zur Ionenaustauschchromatographie werden die Proben bei der RP-HPLC gleichzeitig entsalzt, was bei der Testung der gereinigten antimikrobiellen Peptide von besonderer Bedeutung ist (siehe Ergebnisse der Antibiosetests). Zur hohen Trennschärfe bei der Separation von

kationischen Peptiden trägt auch die Modifizierung der Selektivität der RP-HPLC durch den Gebrauch von Ionenpaarbildnern wie TFA bei.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie werden in verschiedenen Fraktionen der Hämofiltrat- und der Urin-Peptidbank die Massen putativer Defensine identifiziert (Tabelle II, Abschnitt 4.1.2). Zur Analyse und Reindarstellung der verschiedenen Defensine aus diesen Fraktionen wurde ein chromatographisches 3-Schritt-Verfahren entwickelt und auf einen präparativen Maßstab adaptiert. Als Ausgangsmaterial für die präparative Darstellung von hBD-1 aus Blutfiltrat diente ein 10.000 l HF-Äquivalent von pH-Pool 7 Fraktion 25. Die Isolierung der urinalen hBD-1-Varianten erfolgte aus einem 10 l Urin-Äquivalent von pH-Pool 7. HNP-1/2 wurde aus HF-Pool 4 isoliert. Im ersten Schritt wurde das Ausgangsmaterial auf eine RP-C4-Säule geladen und die Peptide in einem linearen Gradienten eluiert. Die Identifikation defensinhaltiger Fraktionen erfolgte mittels MALDI-TOF und ESI-MS. Die individuellen Fraktionen wurden gepoolt, auf einer RP-C18-Säule rechromatographiert und erneut analysiert. Zur abschließenden Reinigung der isolierten Peptide erfolgte eine Chromatographie auf einer RP-C18-Säule mit sehr feinem Säulenmaterial.

Chromatographiebedingungen:	Puffer A:	0,1 % TFA in Wasser
	Puffer B:	80 % Acetonitril, 20 % Wasser, 0,1 % TFA in Wasser
	Säule 1:	RP-C4, 300 Å, 5 µm, 10x125 mm; Biotek, Östringen
	Gradient:	Fluss 2 ml/min, (2 % B/min)
	Säule 2:	RP-C18, 300 Å, 5 µm, 10x250 mm;
	Gradient:	Fluss 0,7 ml/min, 25 %-45 % B in 60 min (0,33 % B/min)
	Säule 3:	RP-C18, 120 Å, 5 µm, 4,6x250 mm oder 10x125 mm;
	Gradient:	Fluss 0,7 ml/min, 20 %-30 % B in 40 min (0,25 % B/min)
	Detektion:	230 nm, 280 nm

Die Identität und Reinheit der Peptide wurde mittels Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und AS-Sequenzierung geprüft. Identische Peptidfraktionen wurden zusammengeführt und lyophilisiert. Die Peptide wurden ausgewogen, aliquotiert und bei -20° C gelagert.

3.3 Peptid-Analytische Methoden

Die Analysenmethoden 3.3.1 - 3.3.6 wurden in der Abteilung „Analytische Peptidchemie“ (IPF) von Dr. M. Raida und Mitarbeitern durchgeführt.

3.3.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie beruht auf der Eigenschaft elektrischer und magnetischer Felder, Ionen nach ihrer Masse, Ladung und ihrer kinetischen Energie zu trennen. Die zu analysierende Probe wird dabei zunächst ionisiert. Anschließend werden die Ionen im Massenanalysator aufgrund ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt. Die Massenbestimmungen erfolgten entweder an einem Elektrospray-Massenspektrometer (Sciex ABI III, Perkin-Elmer, Überlingen) oder mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer (LaserTec RBT II, PerSeptive/Vestec, Houston, TX, USA).

3.3.2 Electrospray-Ionization-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Bei der Massenbestimmung mittels ESI erfolgt die Ionisation durch Versprühen einer flüssigen Phase in einem elektrischen Feld. Zur Massentrennung wird das Hochfrequenzfeld eines Quadrupol-Stabsystems eingesetzt. Die Berechnung der Masse über die Mittelwertbildung vieler mehrfach geladener Ionen eines Moleküls führt bei dieser Methode zu einer hohen Messgenauigkeit von etwa 0,05 %. Die Datenaufnahme erfolgt mit der Software TUNE (Perkin Elmer), die Auswertung mit der Software MacSpec 3.22, Perkin-Elmer, Überlingen.

Die salzfreien, lyophilisierten Proben werden in Analyse-Puffer (50 % (v/v) Acetonitril in 0,2 % (v/v) Essigsäure) gelöst und über eine Hamilton-Spritze mittels einer Infusionspumpe (Harvard Apparatus 22, FMI GmbH, Egelsbach) kontinuierlich mit einem Fluss von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Salzfreie Proben werden benötigt, da Kationen wie Na^+ , Tris- oder Ammoniumionen einen Hintergrund erzeugen, der die Detektion der eigentlichen Probensubstanz unmöglich macht.

Alle Messungen werden im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen. Dabei werden nur Kationen im Spannungsfeld des Massenspektrometers beschleunigt und somit detektiert. Die

verwendete Ionisationsspannung beträgt 5000 V, der detektierbare Massenbereich erstreckt sich von 400 bis 2390 m/z in Schritten von 0,5 m/z.

3.3.3 Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Bei der MALDI-TOF-MS wird die Probe an eine lichtabsorbierende Matrix gebunden, die durch das Einstrahlen von kurzen Laserpulsen verdampft wird. Dabei entstehen neutrale und ionisierte Proben- und Matrixmoleküle, die in ein Vakuumsystem desorbiert werden. Ionen mit unterschiedlichen m/z-Quotienten bewegen sich mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und können so im Flugzeit-Massenanalysator getrennt und analysiert werden. Durch die Messung der Flugzeit im Vakuum kann bei vorausgegangener Kalibrierung die Masse der Teilchen bestimmt werden. Bei der MALDI-Massenbestimmung treten überwiegend einfach geladene Ionen auf, so dass auch komplexe Peptidgemische analysiert werden können. Das Gerät wird mit dem Programm Voyager™ RP Bio-Spectrometry™ Workstation, Version 3.06, PerSeptive Biosystem (Cambridge, USA) gesteuert. Die Auswertung der Daten wird mit der Software Grams/386™ Level II, Version 3.0, Galactic Industries Corporation (Salem, USA) durchgeführt.

Jeweils 1 µl Probe wurde direkt oder in dem Auftragspuffer (50 % Acetonitril, 0,1 % TFA) mit 1 µl der Matrix auf den Probenträger aufgetragen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines Ventilators bei Raumtemperatur getrocknet. Als Matrixsubstanzen dienten gesättigte Lösungen von Sinapinsäure (SIN) und α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHC) in Auftragspuffer. Alle Messungen erfolgten im linearen Modus. Zur Erzeugung des gepulsten Ionenstrahls wurde ein Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm eingesetzt.

3.3.4 Kapillarzonenelktrophorese

Die Kapillarzonenelktrophorese (CZE) ist eine hochauflösende analytische Trennmethode, die hier zur Reinheitsüberprüfung der isolierten Peptide eingesetzt wird. Als Elektrophoresesystem wird ein Gerät der Firma Beckman (P/ACE 2000, Beckman, München) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgt durch die Software „Gold Version 6.01“ (Beckman).

Die zur Trennung verwendeten, mit Polyimid beschichteten Kapillaren (Typ TSP 075375, Composite Metal Services LTD, Polymicro Technology Inc., Phoenix, USA) mit einem inneren Durchmesser von 75 μm und einem äußeren Durchmesser von 400 μm haben eine Gesamtlänge von 57 cm bei einer effektiven Länge bis zum Photometer von 50 cm.

Salzfreie, lyophilisierte Proben werden in VE-Wasser gelöst und durch Anlegen eines geringen Überdruckes in die Kapillare injiziert. Als Injektionsvolumen wurde für Peptidlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml ein Volumen von 6 nl bei einer Injektionsrate von 6 nl/s verwendet. Lösungen mit geringerer Konzentration wurden proportional länger injiziert. Die Detektion der Peptide erfolgt bei 200 nm. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 120 μA und einer Spannung von 16-18 kV bei 35° C durchgeführt. Als Puffer dient 100 mM NaH_2PO_4 , pH 2,5 mit 0,2 mg/ml Hydroxypropylmethylcellulose.

3.3.5 Aminosäureanalytik (ASA)

Zur quantitativen Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung sowie auch zur Quantifizierung des Proteingehaltes wurde eine automatisierte Aminosäureanalyse durchgeführt.

Peptide wurden einer sauren Totalhydrolyse mit 6 M HCl-Lösung für 1 h bei 160° C unterzogen. Die Aminosäuren wurden vor der Auftrennung über die Reversed-Phase-Säule der in dem AS-Analysensystem 1090 II Aminoquant (Hewlett Packard) integrierten HPLC spezifisch derivatisiert. AS mit primären Aminogruppen wurden mit *ortho*-Phtalaldehyd in Gegenwart von 3-Mercaptopropionsäure bei pH 10 umgesetzt. Das bei dieser Reaktion entstandene fluoreszierende Isoindolderivat wurde bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emission bei 450 nm fluorometrisch detektiert. Sekundäre Aminogruppen wurden mit 9-Fluormethylchlorformiat derivatisiert. Dabei entstehen sekundäre Amide. Die Fluoreszenz der Produkte wurde mit Licht der Wellenlänge 266 nm angeregt und die Emission bei 305 nm gemessen. Methodisch bedingt lassen sich Glutamin und Asparagin von ihren entsprechenden Säuren nicht unterscheiden. Cystein wird bei der Hydrolyse vollständig, Methionin zu etwa 40 % zerstört, so dass beide gar nicht oder nur zum Teil erfasst werden können.

Als internen Standard enthält der ASA-Puffer die Aminosäuren Norvalin und Sarcosin.

ASA-Puffer: 0,4 M Natriumborat, pH 7,2; 50 mM Norvalin; 50 mM Sarcosin.

Puffer A: 20 mM Natriumacetat, pH 7,2 (eingestellt mit Essigsäure);
0,018 % (v/v) Triethylamin; 0,3 % (v/v) Tetrahydrofuran.

Puffer B: 20 mM Natriumacetat, pH 7,2 (eingestellt mit Essigsäure);
40 % (v/v) Acetonitril; 40 % (v/v) Methanol.

3.3.6 Peptid-Sequenzierung

Um die isolierten Peptide eindeutig zu identifizieren, wurde deren Sequenz durch schrittweisen Abbau und Nachweis der N-terminalen Aminosäuren analysiert (Edman-Abbau). Die Edman-Sequenzierung [Edman 1956; Hewick 1981] wird auf einem 473A Sequencer mit MicroCartridge (ABI, Weiterstadt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Datenaufnahme, Speicherung und Auswertung erfolgen auf einem Apple MacIntosh IIsi mit der Model 610A Data Analysis Software (Version 1.2.1, ABI, Weiterstadt).

Die Proben werden vor der Sequenzierung gegebenenfalls entsalzt, die Reinheit mit Hilfe der CZE überprüft und die molekulare Masse mit dem Sciex API III bestimmt. 50-100 pmol der Probe werden auf eine mit PolyBreneTM Plus vorbehandelte Glasfasermembran aufgetragen. Der Edman-Abbau wird mit dem Reagenzien-Kit von ABI nach dem Fast Cycle Protokoll durchgeführt. Die Analyse der Phenylthiohydantoin-Aminosäuren erfolgt über RP-Chromatographie (nach Herstellerangaben).

3.4 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden in der Abteilung „Molekularbiologie“ unter der Leitung von Dr. H.J. Mägert durchgeführt. Die Sequenzierungen (Abschnitt 3.4.9) wurden von Dr. H.D. Zucht und Frau M. Klingenberg durchgeführt.

3.4.1 Sterilisation von Lösungen und Materialien

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-QUFplus, Millipore) angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Lösungen, die hitzeempfindliche Bestandteile enthielten, wurden durch Cellulose-Acetat-Filter mit einer Porengrösse von 0,2 μm sterilfiltriert. Glas-, Keramik- und Metallwaren wurden für 4 h bei 180° C trockener Hitze entkeimt.

3.4.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Aufnahme von UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 230-320 nm in einer Quarzglasküvette. Die Berechnung der Konzentration wurde nach folgenden, für eine Schichtdicke von 1 cm geltenden Richtwerten durchgeführt:

1. Doppelstrang-DNA: $c = E_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/ml}$

2. Ribonukleinsäuren: $c = E_{260\text{nm}} \times 40 \mu\text{g/ml}$

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde anhand des E_{260}/E_{280} -Quotienten ermittelt. Für reine Nukleinsäurelösungen sollte er zwischen 1,8 und 2,0 betragen.

3.4.3 Fällung von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung

Die Fällung von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH 4,3 für RNA; pH 5,2 oder pH 6,0 für DNA) und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol. Anschließend wurden die Nukleinsäuren sedimentiert (15.000 xg, 15 min,

4° C) und der Überstand verworfen. Zur Lösung von Salzen wurde das Sediment zweimal mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurden die Nukleinsäuren im Vakuum getrocknet und in einem gewünschten Volumen H₂O aufgenommen.

3.4.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Anschluss an PCR-Reaktionen gemäß ihrem relativen Molekulargewicht erfolgte elektrophoretisch in Agarosegelen. Es wurden Flachbett-Gele mit folgenden Abmessungen, Gelvolumina und durchschnittlichen Elektrophoresespannungen verwendet:

1. Mini-Gele, 90 x 78 x 6 mm, 42 ml, 90 V
2. Midi-Gele, 143 x 138 x 5 mm, 98 ml, 120 V

Sowohl als Puffersystem im Gel als auch als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 1 % (w/v) und 2 % (w/v) verwendet und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 0,2 Volumen Probenpuffer (50 % (v/v) Glycerin, 5 x TAE, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau) vermischt. Die Ansicht der Gele erfolgte mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm und die Dokumentation wurde mittels einer Polaroidkamera durchgeführt. Die relative Größe von unbekanntem DNA-Fragmenten konnte anhand eines im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards bestimmt werden.

Für präparative Gele wurde niedrigschmelzende Agarose ("NuSieve GTG" *low melting point* Agarose, Biozym, Hameln) verwendet. Die DNA wurde nach Ethidiumbromidfärbung (s.o.) mittels aufscheinender Beleuchtung durch eine UV-Handlampe (312 nm) im Gel betrachtet und die Gelbereiche mit den gewünschten DNA-Fragmenten ausgeschnitten.

3.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen und wässrigen Lösungen

Zur Extraktion der gewünschten DNA-Fragmente wurde der QIAquick Gel Extraction Kit eingesetzt. Zur Aufreinigung aus dem PCR-Ansatz, der QIAquick PCR

Purification Kit. Extraktion und Aufreinigung erfolgten genau nach Herstellerangaben und mitgeliefertem Protokoll.

3.4.6 RNA-Extraktion

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte in eiskaltem RNA-Lysispuffer (100 mg Gewebe/ml Lysispuffer) mit einem Ultraturax T25 (30 s bei 8.000 rpm, 30 s bei 15.000 rpm, 1 min bei 24.000 rpm). Durch einen Zentrifugationsschritt (10.000 x g, 10 min, 4°C) wurden unlösliche Bestandteile des Homogenats abgetrennt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Die Isolierung der RNA aus dem Gewebehomogenat erfolgte durch saure Phenolextraktion. Hierfür wurde das Gewebehomogenat mit 0,1 Volumen 3 M NaAc pH 4,3 versetzt, mit gleichem Volumen wassergesättigtem Phenol/Chloroform vorsichtig vermischt und 10 min in Polypropylencarbonatröhrchen zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4°C). Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und die Phenol-/Chloroformextraktion in den oben beschriebenen Volumenverhältnissen wiederholt. Zur Entfernung der Phenolreste folgte eine Chloroformextraktion. Die Fällung der RNA erfolgte dann durch die Zugabe eines gleichen Volumenanteils Isopropanol und durch eine weitere Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4°C). Das Sediment wurde zweimal mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in dem gewünschten Volumen H_2O gelöst. Der Nukleinsäuregehalt der Lösung wurde fotometrisch bestimmt und die Qualität der RNA-Präparation gelelektrophoretisch kontrolliert.

Die Isolierung der mRNA erfolgt mit dem mRNA-Aufreinigungs-Kit von Qiagen nach Standardprotokoll.

3.4.7 Agarosegelelektrophorese von RNA

Für die Gelelektrophorese wurde die gefällte RNA (5-50 μg) in 10 μl Probenauftragspuffer gelöst, für 15 min bei 55°C denaturiert, und die Proben wurden auf ein 1,2 %iges MOPS-Agarosegel mit 1 % Formaldehyd aufgetragen, welches 15 min bei 100 Volt

vorgelaufen ist. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 3-4 h in Flachbettgelapparaturen durchgeführt.

RNA-Probenpuffer in MOPS-Puffer	50 % Formamid
	6,5 % Formaldehyd
	10 µg Ethidiumbromid
	10 % (v/v) Glycerin
	<u>0,01 % (w/v) Bromphenolblau</u>
	in 10 µl Volumen

3.4.8 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird die mRNA eines Gewebes vor der PCR in DNA umgeschrieben. Die aus eukaryontischen Geweben extrahierte Gesamt-RNA wird zunächst mit einem Oligo(dT)-Primer hybridisiert. Hierbei bilden sich zwischen dem Poly(A)-Tail eukaryontischer mRNAs und der Oligo(dT)-Sequenz des Primers doppelsträngige Bereiche aus, die einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) unter geeigneten Reaktionsbedingungen als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges dienen. Das Produkt dieser Reaktion ist ein DNA/RNA-Hybrid, wobei der DNA-Strang eine revers komplementäre Kopie (cDNA) des entsprechenden mRNA-Moleküls darstellt. Der RNA-Strang des Hybrides wird im Anschluss an die reverse Transkription mit RNase-H abgebaut. Die Produkte der Reaktion (cDNA-Erststrang) repräsentieren somit theoretisch die polyadenylierte mRNA-Population einer RNA-Probe. Durch geeignete PCR-Strategien kann anschließend die Genexpression eines Gewebes untersucht oder die mRNA-Sequenz eines neuen Gens durch Amplifikation der entsprechenden cDNA ermittelt werden.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Technik, die es ermöglicht, aus geringsten DNA-Mengen definierte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen [Saiki *et al.*, 1988]. DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigen als Startpunkt für die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges kurze, doppelsträngige Sequenzbereiche. Für die PCR verwendet man zwei synthetische Oligonukleotide („Primer“), die jeweils zu einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind und die gewünschte Sequenz

(Amplikon) einschließen (Sense- und Antisenseprimer). Ein Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion beinhaltet die temperaturgesteuerte Reaktionsfolge von Denaturierung, Annealing und Extension.

Zunächst wird das zu untersuchende DNA-Gemisch („Template“) bei hoher Temperatur (94-99° C) denaturiert und zusammen mit den synthetischen Oligonukleotiden abgekühlt („Annealing“). Während des Annealings bilden sich Hybride zwischen den Einzelsträngen des Amplikons und den entsprechenden Primern aus. Diese doppelsträngigen DNA-Bereiche dienen einer hitzestabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase (z.B. Taq-DNA-Polymerase) als Startpunkte für die Synthese des komplementären Stranges (Extension). Die Extension der Primer wird bei einer Temperatur durchgeführt, die über der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegt und den Annealingvorgang beendet (65-75° C). Da das Extensionsprodukt des einen Primers im nächsten Zyklus als Template des anderen dient, wird theoretisch der durch die Primer eingeschlossene DNA-Abschnitt nach n -Zyklen um $2n$ vermehrt; es kommt also zu einer Kettenreaktion.

Lösungen und Puffer:

10 x Taq-DNA-Polymerase-Puffer (Biomol):	100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , pH 8,8
MgCl₂-Lösung:	50 mM/25mM
Oligonukleotide:	10 µM
dNTP-MIX:	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP
Taq-DNA-Polymerase (Biomol):	4 U/µl / 3 U/µl
PCR-Standardansatz:	10 mM Tris-HCl (pH 8,8)
	50 mM KCl
	1,5 mM MgCl ₂
	0,4 µM jedes Primer
	200 µM dNTPs
	0,04 U/µl Taq-DNA-Polymerase

PCR-Standardansätze wurden in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Ansätze wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung aus den angegebenen Lösungen erstellt, wobei als Template Erststänge bzw. PCR-Voramplifikationen eingesetzt werden. Die Amplifikationen mit der Taq-Polymerase wurden als „hot start“ durchgeführt. Die Zugabe der Taq-DNA-Polymerase erfolgte generell in einem geeigneten Volumen (5 - 10 µl) 1 x Taq-DNA-Polymerase-Puffer bei 72° C nach einer initialen Denaturierung der

3 Material und Methoden

PCR-Ansätze von 5 min bei 95° C. Im letzten Zyklus jeder PCR-Reaktion wurde die Extensionszeit auf 7 Minuten verlängert, um sicherzustellen, dass begonnene Polymerisationen vollständig abgeschlossen wurden. Anschließend wurden die Ansätze bis zu ihrer Entnahme aus dem Gerät auf 4° C gekühlt.

Standard-Temperaturprotokoll:

95° C	5 min	Initiale Denaturierung
72° C	-----	Zugabe von Taq-Pol
95° C	30 s	Denaturierung
55° C	30 s	Annealing max. 40 Zyklen
72° C	30 s	Extension
72° C	7 min	Extension
4° C		Reaktionsende

Für die Amplifikation mit Combi-Polymerase entfällt der „hot start“, das Enzym wird auf Eis vorher hinzupipettiert. Das in dieser Arbeit verwendete PCR-Protokoll wurde durch Variation der Primerkonzentration, der Annealingtemperatur, Reaktionszeiten („Annealingzeit“) und der Zyklusanzahlen optimiert. Alle Reaktionen wurden im Gen-Amp Cyler 2400 der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

3.4.8.1 Primer/Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden aus experimentell ermittelten oder publizierten DNA-Sequenzen abgeleitet und als Auftragssynthese von der Firma ABI, Weiterstadt bezogen.

Bezeichnung	Sequenz 5'- 3'	Ursprung
β-TUB-1	TTCCCTGGCCAGCTGAANGCNGACCTNCGCAAG	β-Tubulin universal
β-TUB-2	CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAAGGC	β-Tubulin universal
hBD-1-F1	CCATGAGAACTTCCTACCTTCTGC	humane Niere
hBD-1-R1	CCAAGTGCTGCAAGTGAG	humane Niere

3.4.8.2 cDNA-Erststrangsynthese

cDNA-Erststrangsynthesen wurden routinemäßig mit 5 µg Gesamt-RNA in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Die RNA wurde gefällt, in 31,5 µl H₂O gelöst, mit 5 µl einer UNIP-5 Primerlösung vermischt (10 µM) und für 10 min bei 70° C denaturiert. Der Ansatz wurde anschließend für eine Minute bei 42° C equilibriert und die Reaktion durch Zugabe von 13,5 µl RT-Premix gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 60 min bei 42° C wurde der Ansatz für 10 min bei 70° C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf 50° C equilibriert, 0,5 µl RNase H (10 U/µl) hinzugegeben und für 10 min bei 50° C inkubiert. Durch eine weitere Inkubation des Ansatzes bei 70° C für 10 min wurde die RNase H inaktiviert. Die so erstellten cDNA-Erststrangsynthese-Ansätze wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20° C gelagert. Als Kontrolle für die cDNA-Erststrangsynthese wurde von jedem cDNA-Erststrang eine PCR mit β-Tubulin-spezifischen Primern durchgeführt. Die Ansatzgröße betrug 25 µl. Als Template wurde cDNA-Erststrang 1:10 (v/v) im Reaktionsansatz verwendet.

5x RTase-Puffer:	250 mM Tris-HCl (pH 8,3) 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂	RT-Premix:	10 µl 5 x RTase-Puffer 2,5 µl dNTP-Lösung 1 µl SuperscriptII™ Reverse Transkriptase (200 U/µl)
Primerkombination:	β-TUB-1/β-TUB-2		
Annealing:	58° C, 20 s		
Zyklusanzahl:	30		

3.4.9 Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz von DNA wurde das von Sanger (1977) beschriebene enzymatische Kettenabbruchverfahren in modifizierter Form verwendet. Die Sequenzierungsreaktionen wurden unter Verwendung von Ampli-Taq-DNA-Polymerase als Enzym durchgeführt. Durch die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase kann die Reaktion als sogenanntes Cycle-Sequencing durchgeführt werden. Analog zur PCR setzt sich eine Reaktionsfolge aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Extension der Produkte zusammen. Zusätzlich zu den normalen dNTPs werden der Taq-Polymerase Didesoxy-Nucleosid-Triphosphate als Substrat angeboten. Werden diese ddNTPs während der Extension in den neu entstehenden Strang eingebaut, kommt es zur basenspezifischen

Termination der Synthese. Da die Reaktionsfolge zyklusweise wiederholt wird, kommt es zu einer Anreicherung der Abbruchprodukte. Im Gegensatz zu anderen enzymatischen Sequenzierungsreaktionen reichen bei dieser Methode geringe DNA-Mengen für eine erfolgreiche Sequenzierung aus. Zur Markierung der Abbruchprodukte werden vier verschiedene Farbstoffe mit unterscheidbaren Fluoreszenzspektren [Smith *et al.*, 1986] eingesetzt, so dass die automatisierte Detektion der spezifischen Produkte in nur einer Gelspur während der Elektrophorese möglich ist. Diese Fluoreszenzgruppen sind entweder im Sequenzierprimer lokalisiert oder direkt an die ddNTPs gebunden. Im ersten Fall wird je ddNTP eine eigene Reaktion durchgeführt (A-, C-, G- oder T-Termination), im zweiten Fall finden alle vier Abbrucharten in einem Reaktionsansatz statt.

Für die Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs unter Verwendung selbstsynthetisierter Oligonukleotide wurde ein Kit der Firma Applied Biosystems eingesetzt (Taq Dye Desoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Best.-Nr. 901497). Das Herstellerprotokoll für die Sequenzierungsreaktion wurde eingehalten. Für jede Sequenzierung ist nur ein Reaktionsansatz nötig. Die Sequenzierung wurde an einem Kapillarelektrophorese-Sequencer durchgeführt (ABI PRISM™ 310 genetic analyser). Die Datenregistrierung erfolgte vollautomatisch.

3.4.10 Herstellung von Gensonden

Als Gensonden wurden humane hBD-1-cDNA-Fragmente verwendet. Die cDNA-Fragmente wurden aus klonierten Sequenzabschnitten mittels PCR amplifiziert und nachfolgend über präparative Agarosegele mit anschließender Aufreinigung dargestellt.

3.4.10.1 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten wurde mit einem Random primed labelling-Kit der Firma Boehringer unter Verwendung von [³²P]-dCTP nach der von Feinberg und Vogelstein (1983) beschriebenen Methode durchgeführt. Bei dieser Methode wird die zu markierende DNA denaturiert und mit Hexanukleotiden zufälliger Basensequenz (random primer) hybridisiert. Die hierbei ausgebildeten Doppelstrangbereiche dienen einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) als Startpunkte für die Synthese. Der

neu synthetisierte komplementäre DNA-Strang wurde durch den Einbau eines [³²P]-dNTP radioaktiv markiert. Für eine Markierungsreaktion wurden routinemäßig 50-75 ng dsDNA verwendet. Die weitere Durchführung entsprach den Herstellerangaben.

3.4.10.2 Reinigung radioaktiv markierter DNA

Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide im Anschluss an die Markierungsreaktion von der markierten DNA abzutrennen, folgte eine Gelfiltration des Ansatzes mit Einwegsäulen ("Nucltrap™ push-columns", Stratagene). Der Ansatz wurde hierfür mit STE-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA) auf ein Endvolumen von 70 µl gebracht und mittels einer Einwegspritze durch die vorab mit 70 µl STE-Puffer equilibrierte Säule gedrückt. Anschließend wurde die DNA mit 70 µl STE-Puffer eluiert.

3.4.10.3 Aktivitätsmessung

Die Messung der ³²P-markierten DNA-Proben fand als Cerenkov-Zählung im Tritiumkanal eines Scintillationszählers (Canberra Packard, 2500 TR) statt. Die spezifische Aktivität in dpm/gDNA wurde (unter Berücksichtigung einer Zählrohrbeute von 30 %) für jede Probe unmittelbar nach der Aufreinigung ermittelt.

3.4.11 Northern-Blot-Analyse

In Anlehnung an den als Southern-Blot bezeichneten vertikalen Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran [Southern, 1975] wird der Transfer von RNA im Anschluss an die Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran als Northern-Blot bezeichnet [Thomas, 1983]. Anstatt der Nitrocellulose kann auch eine Nylonmembran mit positiven Ladungen verwendet werden. Für den Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde eine Elektroblopparatur verwendet. Hierbei wird nach der Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 6-10 V der Elektrotransfer auf die Membran durchgeführt. Die Nukleinsäuren werden dabei durch die angelegte Spannung auf die positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+) transferiert.

Die Transferzeit für den Elektrobplot betrug 45 min. Die Membran wurde anschließend dreimal für 1 min in 500 ml 5x SSC gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Nukleinsäuren mittels UV-Licht (UV-Stratalinker 2400) an der Membran fixiert. Als RNA-Transferlösung wurde MOPS-Puffer verwendet.

3.4.11.1 Hybridisierungen

Die Hybridisierungen membrangebundener Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Gensonden wurden in einem temperierbaren Inkubationsofen (Bachofer, 400 HY) in rotierenden Glasröhren durchgeführt. Pro Röhre wurden 10-20 ml Hybridisierungslösung verwendet. Vor Zugabe der Aktivität wurden die Filter über Nacht in der Hybridisierungslösung bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur equilibriert. Doppelsträngige Gensonden wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung für 5 min bei 100° C im Wasserbad denaturiert. Die Hybridisierungsdauer betrug 12-16 h. Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Filter zur Entfernung nicht gebundener Aktivität und zur Erhöhung der Stringenz der Signale mit SSC-Lösungen gewaschen.

Hybridisierungslösung

1 M NaCl
0,1 M Na₂Citrat
5 x Denhardt's Reagenz
50 mM Tris-Cl pH 8,0
10 % (w/v) SDS
10 % (w/v) PEG (MW 6000)

Waschlösungen 20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M Tri-Natriumcitrat pH 7,0

3.4.11.2 Autoradiographie

Die noch feuchten Filter wurden in Polyethylenfolie eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette mit einem Kodak X-Omat AR5 Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit richtete sich nach der mittels eines Geigerzählers abgeschätzten Aktivität des Filters (Tage). Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte gemäß Herstellerangaben.

3.4.11.3 Computergestützte semiquantitative Analyse der Northern-Blots

Die Northern-Blots wurden semiquantitativ durch eine computergestützte Bildanalyse ausgewertet [Wicht *et al.*, 1999]. Die digitalisierten Bilder der Northern-Blots wurden verwendet um die integrierte Dichte der Banden zu kalkulieren. Die integrierte Dichte der einzelnen Banden wurde in "SUMDENS"-Einheiten (= Summe der Pixeldichte einer spezifischen Bande) ausgedrückt.

3.4.12 *In-situ*-Hybridisierung

Zur Lokalisation der hBD-1-Transkripte im Gewebe wurde die Technik der *In-situ*-Hybridisierung eingesetzt. Gefrierschnitte einer humanen Niere (10 µm) wurden in 4 % *para*-Formaldehyd fixiert. Für die Synthese einer RNA-Sonde wurde ein cDNA-Fragment korrespondierend mit der Peptid-Position Ser33-Lys68 von hBD-1 in einen pGEM-T 5(+)-Vektor (Promega, Madison, WI, USA) geklont. Für die *In-vitro*-Transkription wurde ein „blunt-ended“ PCR-Produkt verwendet, das sowohl ein T7- als auch ein SP6-Promotorelement des Vektors enthält. Die *In-vitro*-Transkription erfolgte mit T7- (sense) oder SP6- (antisense) Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) in der Gegenwart von ³⁵S-UTP (ICN, Eschwege) für 2 h bei 37° C. Anschließend wurde die Template-DNA mit DNase-I (Promega, Madison, WI, USA) entfernt. Die markierte Probe wurde chromatographisch gereinigt (Push-Column, Stratagene, Heidelberg, Germany) und eine Probenmenge entsprechend einer Aktivität von 1 x 10⁶ cpm wurde mit 1 ml Hybridisierungspuffer verdünnt.

Für die Hybridisierungsreaktion wurden die Gewebeschnitte mit 70 µl Hybridisierungspuffer überschichtet, mit silanisierten Deckgläsern eingedeckt und über Nacht bei 50° C inkubiert. Nach einer Waschprozedur wurden die hybridisierten Gewebeschnitte auf einem Röntgenfilm für 4 Tage exponiert, danach in Fotoemulsion getaucht und für weitere 3 Wochen bei 4° C exponiert. (Hyperfilm Betamax, bzw. Hypercoat LM-1 Emulsion, Amersham, Braunschweig). Nach der Filmentwicklung wurden die Gewebeschnitte mit Giemsa-Lösung gegengefärbt.

3.5 Bioassays und Funktionstest

3.5.1 Proteolytische Verdauung von Defensinen

Defensine wurden in dieser Arbeit mit den gastrointestinalen Proteasen Chymotrypsin und Trypsin und mit dem aus *Bacillus subtilis* stammenden Subtilisin fragmentiert. Trypsin hydrolisiert spezifisch Peptidbindungen C-terminal von Lysin und Arginin, Chymotrypsin spaltet an der Carboxygruppe von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, während Subtilisin Peptidbindungen unspezifisch löst. Die enzymatischen Hydrolysen wurden in 100 mM Ammoniumcarbonatpuffer, pH 8,0 bzw. die Hydrolyse mit Subtilisin in 25 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0 durchgeführt. Das Verhältnis von Protease zu Peptid betrug 1 : 100. Nach Inkubation bei 37° C (bis zu 16 h) wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 60° C für 2 min (Subtilisin) bzw. durch Ansäuern der Reaktionslösung mit 0,1 % TFA und anschließendem Lyophilisieren gestoppt.

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Peptide in der Reduktionslösung (250 mM β -Mercaptoethanol in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0) aufgenommen und für 5 min im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen der Proben wurden die Reaktionsprodukte mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht und ggf. über RP-HPLC getrennt.

3.5.2 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von Defensinen

Die antimikrobielle Potenz der Peptide wurde an folgenden Mikroorganismen getestet: *Escherichia coli* BL21, *Escherichia coli* K12 (ATCC 23716), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus carnosus* TM300, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Neisseria cinerea* (ATCC 14685), *Bacillus megaterium* (ATCC 14581), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) und *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525).

Der Umgang mit den Mikroorganismen erfolgte unter sterilen Arbeitsbedingungen. Die Lagerung der Bakterien erfolgte in Form von Dauerkulturen und Arbeitskulturen. Zur Herstellung einer Dauerkultur wurde 1 ml einer dicht bewachsenen Übernachtskultur mit 1 ml sterilem Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80° C gelagert. Arbeitskulturen wurden auf Agarplatten angelegt. Hierzu wurde ein Aliquot einer Bakteriensuspension mit einer Impföse

3 Material und Methoden

auf Petrischalen mit 1,5 % Agar in dem Nährmedium ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37° C bzw. 30° C über Nacht kultiviert und die bewachsenen Platten bei 4° C bis zu 3 Monaten gelagert.

Die nebenstehende Abbildung zeigt eine Arbeitskultur der Hefe *Rhodotorula rubra*.



Für die Vermehrung der Bakterien wurden Kulturröhrchen mit 5 ml des jeweiligen Nährmediums mit einer Impföse beimpft und über Nacht bei 30° C bzw. 37° C im Kulturschüttler bei einer Drehzahl von 200 Upm inkubiert.

Die antimikrobielle Potenz der Peptide wurde mit dem Radial-Diffusionshemmtest nach Lehrer *et al.* (1991) untersucht. Bei diesem Test wird die antimikrobielle Wirkung von Probelösungen auf in Agarose suspendierte Bakterien getestet.

Agaroselösungen für Inkubation bei

<u>37° C</u>	und	<u>30° C</u>
30 mg Tryptic Soy Broth (TSB)		30 mg Tryptic Soy Broth (TSB)
0,7 % (w/v) Agarose ohne EEO		0,8 % (w/v) GTG-Agarose
0,02 % (v/v) Tween 20		0,02 % (v/v) Tween 20

werden in 100 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst, aufgeköcht und bis zur Anwendung bei 50° C bzw. 37° C im Wasserbad temperiert.

Zu 100 ml temperierter Agaroselösung wurden 0,5 ml einer Bakteriensuspension in Nährmedium, die eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 600 nm aufwies, gegeben. Die Agaroselösung wurde in Petrischalen gegossen und bei 4° C bis zur Aushärtung gelagert. Zur Durchführung des Testes wurden mit einem abgeflammt Stahlzylinder Löcher mit 3 mm Durchmesser in die Agarose gestanzt und die entstandenen Agarosezylinder durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuums mit einer abgeflammt Pasteurpipette entfernt. In die Löcher wurde 10 µl Probelösung pipettiert. Zur Herstellung der Probelösungen wurden die

Peptide lyophilisiert, abgewogen, eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2 µg Peptid/µl sterilem, bidestilliertem Wasser hergestellt und diese durch Serienverdünnung mit sterilem Wasser auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Testplatten wurden entweder bei 30° C (Hefen, Bacilli, Pseudomonas, Micrococcus) oder bei 37° C (alle anderen Stämme) für 16 h im Brutschrank inkubiert.

Zur Auswertung wurden die entstandenen Hemmhofdurchmesser (Inhibitionszonen) direkt oder nach Färbung der Platten mit Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt, Germany) gemessen und die Radien berechnet: $r' = d / 2 - 1,5 \text{ mm}$. Der Logarithmus der Antibiotikakonzentration und der Hemmhofradius sind linear miteinander korreliert.

Entsprechend der Arbeit von Lehrer *et al.* (1991) wurde ein Inhibitionsradius (r') von 1 mm einer Aktivität von 10 Einheiten gleichgesetzt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Aktivität von hBD-1 wurde mit der der Referenzpeptide HNP-2, Magainin II und Casocidin I verglichen.

3.5.3 Zellkultur und WST-1-Überlebensassay

Um den Einfluss von Defensinen auf Säugerzellen abzuschätzen wurde ein Überlebensassay (WST-1-Assay, Boehringer Mannheim) mit drei verschiedenen Zelllinien (NIH-3T3 Swiss Mouse Embryo-Fibroblasten, humane monozytenähnliche THP-1, humane Kolonkarzinom-Epithelien T 84) durchgeführt. Der WST-1-Assay misst in erster Linie Zellüberleben/-vitalität von Zellen und nicht Proliferation. Bestimmt wird die Überlebensqualität der Zellen durch die Aktivitätsmessung mitochondrialer Enzyme mit dem WST-1-Zell-Proliferationsreagenz (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonat).

Nachfolgend ist das Durchführungsprotokoll am Beispiel der adhärent wachsenden NIH-3T3 Swiss Mouse Embryo-Fibroblasten (DSM ACC 59) dargestellt. Die Durchführung mit den ebenfalls adhären T-84-Zellen und der Suspensionszelllinie THP-1 erfolgte entsprechend.

Die Zellen wurden bei 37° C im Brutschrank unter 10 % CO₂ in 75 ml Kulturflaschen kultiviert. Am 1. Tag des Experimentes wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,5 % Trypsin-EDTA abgelöst. Nach 2' bis 5'-Inkubation wurde die Zell-Trypsin-Lösung in Kulturmedium aufgenommen und 10 min bei 300 x g

3 Material und Methoden

abzentrifugiert. Die Zellen wurden wiederum in Medium aufgenommen, das Zellpellet sorgfältig mit der Pipette resuspendiert und die Zellen ausgezählt. Die Lösung wurde auf $0,5-1 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Pro Kavität wurden ca. 5.000 Zellen auf einer 96-Well-Platte (TC-Microwell 96; Nunc # 167008) ausplattiert und erneut im Brutschrank kultiviert. Für jeden Wert wurden drei Messpunkte angesetzt.

Am 2. Tag erfolgte eine qualitative Prüfung von Adhärenz und Zelldichte mit dem Mikroskop. Die Zellen müssen subkonfluent sein, da sie sonst in den Arrest gehen (Kontaktinhibition) und nicht mehr auf Stimuli reagieren. Anschließend wurden die Zellen in den Kulturplatten mit PBS gewaschen und in Medium mit 0,1 % FCS im Brutschrank kultiviert (Hungerperiode).

Nach 16 h Pre-Inkubation wurden die Zellen wiederum gewaschen und jeweils 100 µl einer Serienverdünnung der entsprechenden Peptide von 1 bis 20 µg/ml gelöst in Medium mit 0,0, 0,1 und 10 % FCS zugegeben. Medium ohne Peptide oder mit Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) (Genzyme Virotech, Rüsselsheim) dienten als Kontrollen. Nach einer Inkubation für 24 h, 48 h und 72 h wurden die überlebenden Zellen mit dem WST-1-Substrat entsprechend des Herstellerprotokolls fotometrisch detektiert. Die die Zellviabilität reflektierende Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm aufgenommen. Die Zellviabilität in der Gegenwart von Defensin oder TNF- α wurde in Relation zur Mediumkontrolle gesetzt. Im Anschluss an die WST-1-Messung können die Zellen in der Kavität mit eiskaltem Methanol fixiert werden. Die Färbung erfolgte mit verdünnter Giemsa-Färbelösung (1 Vol Giemsa, Merck auf 20 Vol 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8).

3.6 Immunologische Methoden

Tierexperimente wurden unter der Leitung von PD Dr. M. Meyer, Abteilung „Funktionsanalyse“ durchgeführt. Injektionen und Blutentnahmen erfolgten unter Anleitung von Dr. A. Heitland.

3.6.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Kleine Epitope und Haptene (< 2 bis 5 kD) sind häufig wenig immunogen und zur Auslösung einer Immunantwort auf ein Trägermolekül angewiesen. Das zur Immunisierung verwendete native Peptid hBD-1-(D₃₃-K₆₈) wurde über Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid) an Hemocyanin (*Limulus polyphemus* hemolymph Type VIII, Sigma) und Thyroglobulin (Porcine, Sigma) als Carrier gekoppelt.

1 mg Peptid wurde in 200 µl H₂O aufgenommen und in 2 Aliquots zu 100 µl geteilt. Zu jeweils einem Aliquot wurde entweder 5,7 mg Hemocyanin (MW_{monomer}: 70 kDa) in 200 µl H₂O oder 5,7 mg Thyroglobulin (MW: 660 kDa) in 200 µl H₂O gegeben sowie je 450 µg Carbodiimid in 75 µl H₂O zugesetzt. Nach Inkubation für 20 h im Dunkeln bei 4° C wurde die Reaktion mit 6,9 mg Hydroxylamin in 100 µl H₂O gestoppt. Die Ansätze wurden vereinigt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ml aufgefüllt. Die Antigenlösung wurde in geeignete Aliquots geteilt und bis zur Anwendung bei -20° C gelagert.

Für die Immunisierung wird das gekoppelte Peptid mit Freund's Adjuvans emulgiert. Grundsätzlich besteht Freund's Adjuvans aus einem Mineralöl und einem Detergens, das für die Herstellung einer stabilen Emulsion notwendig ist. Das Mineralöl ist nicht resorbierbar. Nach der Injektion bleibt somit dauerhaft ein Öldepot als Fremdkörper am Ort der Injektion. Komplettes Freund's Adjuvans (cFA) enthält außerdem noch abgetötete Mykobakterien als Immunstimulans. Diese fehlen im inkompletten Freund's Adjuvans (iFA).

Es wurden 5 weibliche NZB x NZW-Mäuse im Alter von 6 - 8 Wochen mit einer neuen Technik immunisiert, bei der den Tieren das Antigen beidseitig subcutan (sc) in den unteren Beinbereich außen knieaufwärts in die Hinterläufe injiziert wird. Die Immunisierung erfolgt damit in direkter Nähe zu den poplitealen Lymphknoten. Im Laufe von 17 Tagen werden diese Injektionen sechsmal vorgenommen. Zur Orientierung während der Injektion wird das Fell an den Beinen vorsichtig mit einer Schere entfernt. Parallel zur subcutanen

3 Material und Methoden

Injektion wird den Mäusen bei den zwei ersten Behandlungen zusätzliches Antigen intraperitoneal (ip) appliziert.

Das gekoppelte Peptid wurde 1:1 (v/v) mit Freund's Adjuvans bzw. physiologischer Kochsalzlösung gemischt und nach folgendem Immunisierungsschema appliziert:

Tag 17	Priming	6 µg Antigen sc (3 µg Ag in 10-20 µl Applikationsemulsion mit cFA pro Hinterlauf) 20 µg Antigen ip in 250 µl Applikationsemulsion mit cFA
Tag 14	Boost 1	6 µg Antigen sc (3 µg Ag in 10-20 µl Applikationsemulsion mit iFA pro Hinterlauf) 10 µg Antigen ip in 250 µl Applikationsemulsion mit iFA
Tag 10	Boost 2	6 µg Antigen sc (3 µg Ag in 10-20 µl Applikationslösung mit NaCl pro Hinterlauf)
Tag 7	Boost 3	6 µg Antigen sc (3 µg Ag in 10-20 µl Applikationslösung mit NaCl pro Hinterlauf)
Tag 4	Boost 4	6 µg Antigen sc (3 µg Ag in 10-20 µl Applikationslösung mit NaCl pro Hinterlauf)
Tag 1	Boost 5	6 µg Antigen sc (3 µg Ag in 10-20 µl Applikationslösung mit NaCl pro Hinterlauf)

Am **Tag 0** wurden die Mäuse leicht mit Ether narkotisiert und über den Plexus retroorbitalis mittels einer abgebrochenen heparinisierten Kapillare entblutet. Das Blut wurde in Reaktionsgefäßen aufgefangen, zum Gerinnen 2 h bei RT gelagert, zentrifugiert (10 min, 4° C, 10.000 x g) und das Serum abgehoben. hBD-1-immunreaktive Seren mit ausreichendem Antikörpertiter (siehe 3.6.2) wurden vereinigt, mit 9 Volumenteilen „Antibody Diluent“ (ICN, Hamburg) versetzt und die Antiserumlösung bis zur Testung und Anwendung in verschiedenen Nachweissystemen bei 4° C gelagert.

3.6.2 ELISA zum Nachweis von Antikörpern

Zum Nachweis von hBD-1-Antikörpern wurden alle Seren in einem ELISA Testsystem geprüft. Der ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) ist ein schnelles und auch für eine größere Anzahl von Proben geeignetes Testsystem für die Suche nach den gewünschten Antikörpern. Das lösliche Peptid (Antigen), gegen das die Antikörper gesucht werden, kann dabei direkt durch unspezifische Bindung an eine Mikrotiterplatte gebunden werden. Die so vorbereiteten Näpfe der Platte werden darauf mit den Maus-IgG enthaltenden Seren inkubiert. Antigen-spezifische Antikörper binden sich dabei an das Antigen und sind dann ebenfalls an der Festphase gebunden. Die Näpfe werden dann mit enzymmarkierten IgGs, die gegen Maus-IgG gerichtet sind, inkubiert. Das Enzymkonjugat bindet nur in Näpfen, die bereits im vorhergehenden Schritt Maus-IgGs gebunden haben. Gebundene

antigenspezifische Maus-IgGs können nun mit Hilfe einer von dem eingebrachten Enzym katalysierten Farbreaktion mit einem Plattenfotometer nachgewiesen werden.

96-Depot-Immunoassayplatten mit hoher Proteinbindungskapazität (Maxisorb™, Nunc, Dänemark) wurden mit 20 nM Antigen (synthetisches hBD-1-D₃₆-K₆₈) in Karbonat/Bikarbonatpuffer, pH 9,6 beschichtet (100 µl/Depot, 16 h, 4° C) und anschließend gewaschen (dreimal je 200 µl PBS mit 0,05 % TWEEN 20/Depot). Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Nach der Beschichtung wurden unspezifische Bindungsstellen mit Gelatine geblockt (1 % Gelatine in Karbonat/Bikarbonatpuffer, pH 9,6) und die Platten erneut wie oben gewaschen. Danach wurden jeweils 100 µl einer seriellen Verdünnung der Antiseren (1 : 10 bis 1 : 10.000) aufgetragen. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. Im Anschluss an eine zweistündige Inkubationsperiode und drei weiteren Waschschritten wurde ein Kaninchen-anti-Maus IgG konjugiert mit Meerrettichperoxidase zugegeben (je 100 µl einer 1 : 30.000 Verdünnung/Depot) und 1 Stunde inkubiert. Nach weiteren Waschschritten erfolgte der Nachweis des Antigen-Antikörper-Enzym-Komplexes durch Zugabe von TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin), welches in Anwesenheit von H₂O₂ zu einer farbigen Substanz oxidiert wird. Die Reaktion wurde mit 2 M H₂SO₄ gestoppt und der enzymatische Substratumsatz fotometrisch erfasst. Es wird um so mehr Farbstoff gebildet, je mehr nachzuweisende Substanz (spezifischer Antikörper) in der Probe an die Antigene der Gefäßwand binden kann.

3.6.3 Western-Blot-Analysen

Als weiteres Testsystem wurden Immunoblots in Form von Dotblots und Western-Blots herangezogen, einerseits um Sensitivität und Spezifität des generierten Antiserums zu testen und andererseits um das hBD-1-Peptid in Zellextrakten nachzuweisen.

Für den Western-Blot wurden Aliquots mit entsprechender Peptidkonzentration mit Probenpuffer (Endkonzentration: 4 % SDS, 50 mM Tris-HCL, pH 8,45, 1 mM EDTA, 3,24 mM Dithiothreitol, 12,5 % Glycerin, 0,002 % Bromphenolblau) gemischt und für 5 min bei 95° C reduziert. Die Proben wurden in Anlehnung an die Methode von Schägger und Jagow (1987) auf vorgefertigten Tris-Trycine-Minigelen (BioRad, München) elektrophoretisch getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Peptide auf eine hydrophobe

Polyvinyl-Difluorid-Membran (PVDF) transferiert (Semi-Dry-Blot; Spannung 6 V, 60 mA bei 2 Mini-Gelen (ca. 10 x 8 cm); Blotdauer 1 h) Zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen anschließend mit 3 % FCS und 1 % Gelatine in Tris-gepufferter Salzlösung, TBST, (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,05 % TWEEN 20, pH 8,0) für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurden die Membranen 1 - 3 h mit dem spezifischen Antiserum inkubiert. Im Anschluss an weitere Waschschritte wurden immunreaktive Peptide nach einer ½-stündigen Inkubation mit alkalische Phosphatase konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-indoylphosphat (BCIP) als Chromogen sichtbar gemacht.

Zur Durchführung der Dotblots wurden die Peptide direkt auf eine PVDF-Membran pipettiert, luftgetrocknet und anschließend wie oben beschrieben immungefärbt.

3.6.3.1 Extraktion der Peptide aus Zellen

Die Gewinnung von humanen primären Lymphozyten und Granulozyten erfolgte aus heparinisiertem Vollblut verschiedener gesunder Probanden mit dem Zellisolationsmedium HistoPrep™ (Sigma Produkt Nr. H 4153) genau nach Angaben des Herstellers.

Zur Proteinextraktion wurden frisch kultivierte oder isolierte Zellen dreimal mit PBS gewaschen, gezählt und abschließend zentrifugiert (10 min, 300 x g, RT). Das gewaschene Zellsediment wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Extraktion bei -80° C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in Homogenisationspuffer (20 mM Tris/HCl pH 6,8, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Pepstatin, 2 µg/ml Leupeptin) resuspendiert (5 x 10⁶ Zellen pro ml Puffer). Der Zellaufschluss erfolgte unter ständiger Kühlung im Eisbad mittels eines Ultraturrax und anschließender Sonifikation mit einem Ultraschallgerät (Ultrasonic Desintegrator Sonoplus HD 70, Bandelin). Die Homogenate wurden zentrifugiert (14.000 x g, 15 min, RT) und die Überstände abgenommen. Zur Verwendung in Immunoblots wurden die Peptide aus den Überständen mit 4 Volumen eiskaltem Aceton gefällt, mit sterilem Wasser resuspendiert, auf eine Endkonzentration von 2 µg/µl eingestellt und bei -20° C bis zur Analyse der löslichen Proteine eingefroren.

Die Pellets wurden zweimal mit Homogenisationspuffer gewaschen, in SDS-Probenpuffer (s.o.) mit 1 mM PMSF, 2 µg/ml Pepstatin, 2 µg/ml Leupeptin resuspendiert, erneut 30 s sonifiziert und 5 min bei 95° C gekocht. Abschließend wurden die

Proben 20 min bei RT zentrifugiert (14.000 x g). Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets verworfen.

Der Proteingehalt der Überstände wurde mit einem kommerziellen Proteinbestimmungsassay (BCA-Assay, Pierce, Rockford, USA) gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

3.6.4 Immunhistologischer Nachweis von hBD-1 in Geweben

Der immunhistologische Nachweis von hBD-1 erfolgte an in Paraffin eingebetteten, *para*-Formaldehyd fixierten, humanen Geweben. Von den Geweben wurden 5 µm dünne Schnitte hergestellt und auf silanisierte Glasobjektträger montiert.

Für die Immunfärbung wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert, zur Inaktivierung endogener Peroxidase 30 min in H₂O₂/Methanol (3,6 ml 30 % H₂O₂ in 100 ml Methanol) inkubiert und in TBS gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in eine Blockierlösung überführt (2 % Ziegen Serum in Rotiblock^R (Roth, Karlsruhe), 1 % Saponin) um unspezifische Bindungen zu minimieren.

Für die Inkubation mit dem 1. Antikörper wurde eine 1 : 10 Verdünnung des Maus-anti-hBD-1-Antiserums in TBS mit 5 % FCS und 0,3 % Triton X 100 hergestellt und auf die Gewebeschnitte pipettiert. Nach intensivem Waschen mit TBS folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Peroxidase konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG, Sigma, Deisenhofen). Der 2. Antikörper wurde 1 : 100 verdünnt im selben Puffer wie der 1. Antikörper eingesetzt. Immunreaktives Peptid wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma) und H₂O₂ visualisiert. Die Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Es ist essentiell, dass die Proben niemals austrocknen. Die immungefärbten Präparate wurden mit Hematoxylin (Accustain Gill No. 1, Sigma) gegengefärbt, entwässert und mit Malinol (CHROMA, Köngen) eingedeckt. Ein detailliertes Arbeitsprotokoll für den immunhistologischen Nachweis von hBD-1 ist nachfolgend aufgeführt.

Arbeitsprotokoll für den immunhistologischen Nachweis von hBD-1, HNP-1/3 und ECP.

Entparaffinieren	Orangenterpen	10 min	
	Orangenterpen	10 min	
	Ethanol 100 %	10 min	
	Ethanol 96 %	10 min	
	Ethanol 70 %	10 min	
	Ethanol 50 %	3 min	
	Wasser	1 min	
	Methanol	1 min	
Endogene Peroxidase blockieren	Methanol/H ₂ O ₂	30 min	3,6 ml H ₂ O ₂ (30 %) per 100 ml Methanol
Waschen	TBST (S)	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0 + 0,01 % TWEEN 20 + 1 % Saponin
Waschen	TBS	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0
Waschen	TBS	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0
Unspezifische Bindung blockieren	Block-Puffer	30 min	Rotiblock ^R (Roth, Karlsruhe): TBS (1:10); 2 % Ziegen Serum
Waschen	TBST (S)	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0 + 0,01 % TWEEN 20 + 1 % Saponin
1. Antikörper inkubieren	Maus-anti-hBD-1 (β-Defensin) 1:10 DEF3 (alpha-Defensin) 1:1.000 EG2 (ECP/EPX) 1:150	90 min	verdünnt mit Blockpuffer + 0,3 % Triton X 100
Waschen	TBST (S)	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0 + 0,01 % TWEEN 20 + 1 % Saponin
Waschen	TBS	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0
Waschen	TBS	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0
2. Antikörper inkubieren	Ziege-anti-Maus-IgG	30 min	IgG Peroxidase-konjugiert 1:100 in Blockpuffer + 0,3 % Triton X 100
Waschen	TBS	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0
Waschen	TBS	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0
Waschen	TBS	5 min	150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0
Färben	DAB (Substrat-Chromogen Lösung)	5 - 15 min	Färbedauer unter Mikroskop kontrollieren
Färbung abstoppen	Wasser	1 min	
Gegenfärbung	Hematoxylin	10 - 20 s	Accustain, Gill No. 1, Sigma
Bläuen	fließendes Wasser	10 - 20 s	
Entwässern und montieren	Ethanol 70 %	3 min	
	Ethanol 96 %	3 min	
	Ethanol 100 %	3 min	
	Orangenterpen	3 min	
	Orangenterpen	3 min	
	Malinol		24 h bei RT trocknen lassen

Dieses Protokoll ist geeignet für die Immunfärbung von Formalin- und Bouin-fixierten Geweben, Zytospins sowie Ausstrichpräparate von Gesamtblut. Die Art der Gewebefixation, Inkubationszeiten, Serumverdünnungen usw. wurden durch Variation dieser Parameter ermittelt und optimiert.

3.6.4.1 Evaluation der Immunfärbung

Zur Kontrolle der Spezifität der hBD-1-Immunfärbung wurden entsprechend präparierte serielle Gewebeschnitte mit Pre-Immunsrum (T0) sowie mit anderen „irrelevanten“ Antikörpern (DEF3 verdünnt 1 : 1.000; EG2 verdünnt 1 : 150) behandelt. Zur Beurteilung der Hintergrundfärbung wurde in allen Experimenten bei einem Präparat die Inkubation mit dem 1. Antikörper durch eine Inkubation mit Blocklösung ersetzt (Negativkontrolle). Alle Präparate wurden von zwei unabhängigen Experimentatoren begutachtet und ausgewertet.

Um Beziehungen zwischen immunhistologischen Befunden und anderen patientenbezogenen Daten untersuchen zu können, wurden nachfolgende Kriterien zur Bewertung der Immunfärbung festgelegt.

Färbungsmusters für hBD-1:

- , Keine immunreaktiven Zellen
- + , Vereinzelt immunreaktive Zellen
- ++ , Moderate Anzahl von immunreaktiven Zellen
- +++ , Sehr viele immunreaktive Zellen

Eine Infiltration des Gewebes durch Neutrophile, repräsentiert durch die Färbung mit dem anti-HNP-1 bis 3 Antikörper, wurde folgendermaßen quantifiziert:

- , Keine PMNs
- + , Vereinzelt positive Zellen
- ++ , Fokale Infiltration in der Lamina propria
- +++ , Moderate Infiltration überall in der Lamina propria
- ++++ , Schwere Infiltration überall in Lamina propria und Epithelium

3.7 Statistik

Daten werden, wenn es nicht anders angegeben ist, als Median und Standardabweichung dargestellt. Der Vergleich verschiedener Patientengruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test mit Bonferroni's Korrektur für zwei Stichproben und mit dem Kruskal-Wallis Test für drei Proben.

4.0 Ergebnisse

4.1 β -Defensin-1 in humanen Körperflüssigkeiten

4.1.1 Identifizierung von hBD-1 in Hämofiltrat und Urin

hBD-1 wurde erstmals als Peptid mit 36 AS identifiziert [Bensch *et al.*, 1995]. Es ist die im Blut zirkulierende Form des N-terminal verkürzten, 68 AS langen Prepropeptides. Auf der Suche nach hBD-1 in anderen Körperflüssigkeiten ergaben peptidanalytische Untersuchungen Hinweise, dass hBD-1 auch im humanen Urin vorkommt. Mittels systematischer massenspektrometrischer Analyse der Urin- und Hämofiltratpeptidbank wurden alle theoretisch möglichen Varianten von hBD-1 gesucht (Abb. 4.1).

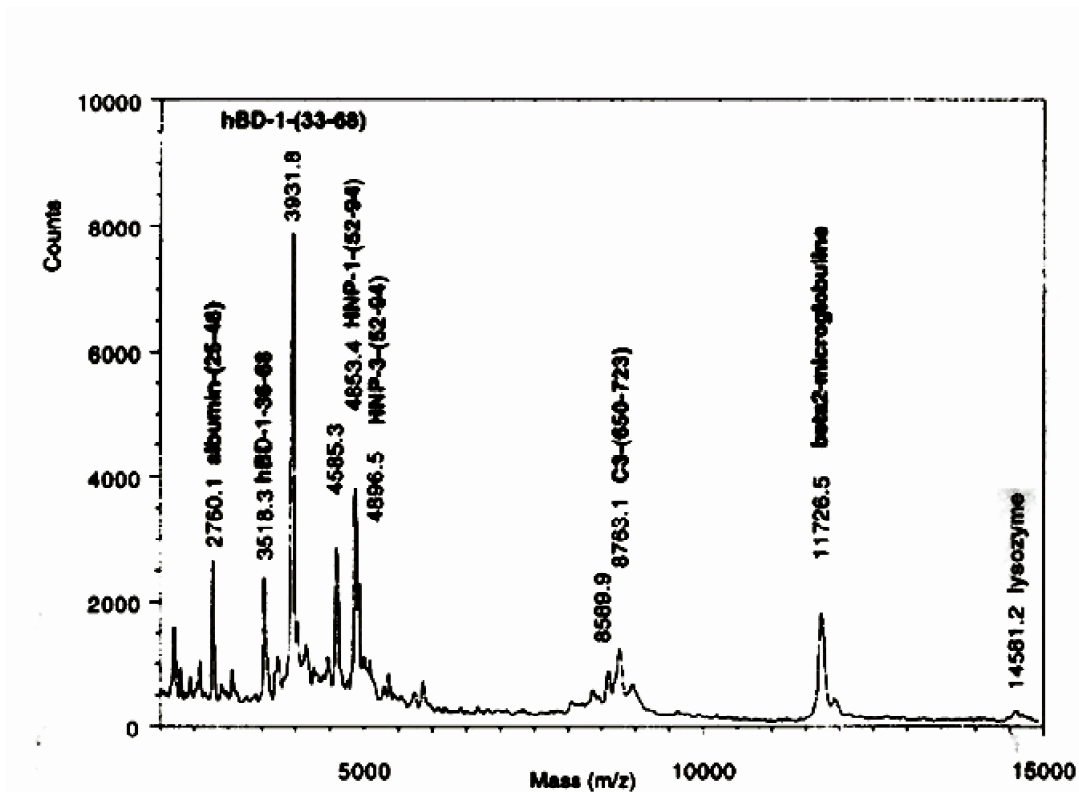


Abb. 4.1: Massenspektrometrische Analyse einer Präparation basischer Polypeptide aus humanem Hämofiltrat (Hämofiltrat, pH-Pool 7, Fraktion 25). hBD-1-(D₃₃-K₆₈) tritt als Hauptkomponente auf. Identifiziert sind weiter hBD-1-(N₃₆-K₆₈) sowie verschiedene N-terminal verkürzte Formen der α -Defensine HNP-1 und HNP-3.

Die Kombination der chromatographischen Fraktionierung und massenspektrometrischen Detektion erlaubt es, peptidhaltige Fraktionen ohne Kenntnis ihrer Funktion(en) im Hinblick auf Molekülvarianten bestimmter Peptide zu analysieren. So können unterschiedliche Molekülformen von hBD-1 ohne Einsatz von biologischen Tests gewonnen und anschließend funktionell charakterisiert werden.

4.1.2 Molekulare Defensin-Varianten in Hämofiltrat und Urin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Varianten von hBD-1 systematisch im Hämofiltrat und im Urin identifiziert (Tabelle II). Auf der Grundlage möglicher enzymatischer Hydrolysen von Defensinmolekülen wurden die Massen theoretisch entstehender Spaltprodukte berechnet und die Massenspektrogramme der verschiedenen Fraktionen von Hämofiltrat- und Urin-Peptidbank auf das Vorhandensein dieser potentiellen Defensinmoleküle untersucht. Mögliche Kandidaten wurden isoliert, die Masse der Peptide bestimmt und die Identität durch N-terminale Aminosäuresequenzierung bestätigt. Damit sind nach unserer Auffassung die wichtigsten hBD-1-Moleküle dargestellt.

Tabelle II: Zusammenfassung identifizierter Defensine in Hämofiltrat und Urin

Peptid	Variante	Herkunft	kalkulierte Masse (Da)	mittlere Masse (Da) ESI-MS (+/- 0.02%)	Menge (pmol/l)	
					U	HF
hBD-1	L25-K68	U/HF-Pool 7	4.750,4	4.750,5	5.000	3
hBD-1	T26-K68	U/HF-Pool 7	4.637,3	4.637,3	1.000	1,6
hBD-1	G29-K68	U/- Pool 7	4.366,1	4.366,9	5	-
hBD-1	D33-K68	U/HF-Pool 7	3.928,5	3.928,6	5	520
hBD-1	N36-K68	-/HF-Pool 7	3.513,1	3.513,1	-	170
HNP-1/2	E20-C94	HF-Pool 4	8.232,4	8.232,5	n.a.	8
HNP-1/2	L22-C94	HF-Pool 4	8.006,2	8.006,2	n.a.	5
HNP-3	L22-C94	HF-Pool 4	8.050,2	8.050,3	n.a.	20
HNP-1/2	R25-C94	HF-Pool 4	7.693,8	7.693,9	n.a.	8
HNP-1/2	V29-C94	HF-Pool 4	7.222,3	7.222,4	n.a.	2
HNP-1/2	S52-C94	HF-Pool 7	4.846,7	4.846,7	n.a.	0,5
HNP-3	S52-C94	HF-Pool 7	4.890,7	4.890,7	n.a.	0,5

Alle Peptide wurden mittels Massenspektrometrie und Peptidsequenzierung identifiziert. Die Peptidmengen wurden aus den initialen Ausbeuten der Aminosäuresequenzierung abgeschätzt. Abkürzungen: HF, Hämofiltrat; U, Urin; n.a., nicht analysiert.

Alle identifizierten β -Defensinpeptide waren N-terminal verkürzte Formen des 68 AS langen Prepro-hBD-1.

Die quantitativ im Urin vorkommende Hauptform ist das 44 AS enthaltende hBD-1-(L₂₅-K₆₈) mit einer mittleren Masse von 4750,5 Dalton. Es ist die längste detektierbare Form in beiden Körperflüssigkeiten. Im Urin kommen drei weitere N-terminal verkürzte Peptide (hBD-1-(T₂₆-K₆₈), hBD-1-(G₂₉-K₆₈) und hBD-1-(D₃₃-K₆₈)) mit mittleren Massen von 4637,3, 4366,9 und 3928,6 Dalton vor (Abb. 4.2). Die Konzentration der drei Varianten ist eine Größenordnung geringer als die der Hauptform.

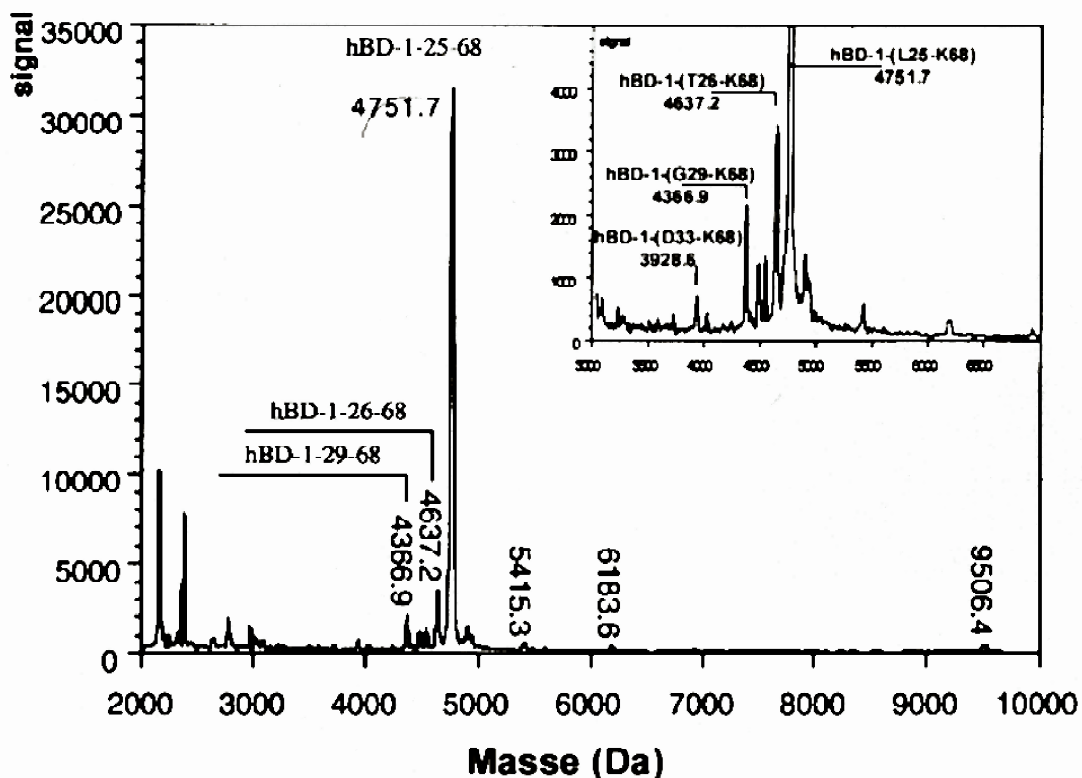


Abb. 4.2: hBD-1-Varianten in humanem Urin. MALDI-MS einer Subfraktion von Urin pH-Pool 7. Appliziert wurden 1 μ l Eluat mit α -Cyano-4-hydroxymizinsäure als Matrixsubstanz. Der Ausschnitt oben rechts zeigt eine Vergrößerung des relevanten Massebereiches. Ordinate: Ratio von relativer Masse und Ladung (m/z).

Im Hämofiltrat findet sich ein anderes Verteilungsmuster von hBD-1-Varianten. In den höchsten Konzentrationen kommen die 36- und 33-AS-langen Peptide hBD-1-(D₃₃-K₆₈) und hBD-1-(N₃₆-K₆₈) vor. Die beiden längeren Peptide hBD-1-(L₂₅-K₆₈) und hBD-1-(T₂₆-K₆₈) werden nur in Spuren detektiert (Abb. 4.3 A).

gefolgt von der *in vivo* nicht nachweisbaren Variante hBD-1-(R₃₁-K₆₈). Die kürzeste beobachtete Variante ist hBD-1-(N₃₆-K₆₈). Die Bildung der *in vivo* detektierten Variante hBD-1-(T₂₆-K₆₈) ist nicht nachweisbar. Vermutlich kann die Endoprotease Chymotrypsin eine einzelne endständige Aminosäure nicht hydrolysieren.

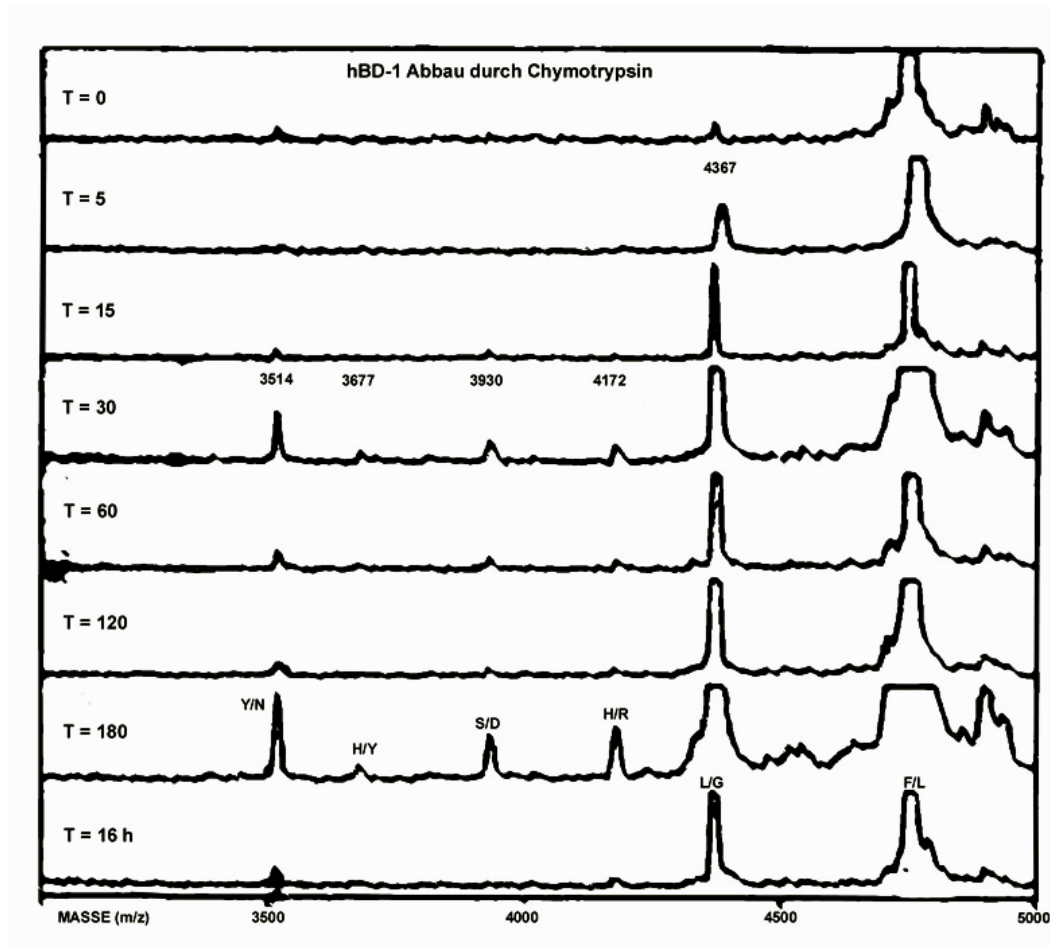


Abb. 4.4: Proteolyse von hBD-1 durch Chymotrypsin. Massenspektroskopische Analyse der Spaltprodukte nach verschiedenen Inkubationszeiten (T in min). Die Aminosäuren der Spaltstellen sind im Einbuchstabenkode angegeben.

Trotz mehrerer potentieller Spaltstellen wird keine Degradation des C-terminalen Anteils von N₃₆ bis K₆₈ beobachtet. Obwohl der N-terminale Teil des hBD-1-Moleküls für Chymotrypsin zugänglich erscheint, ist die enzymatische Reaktion sehr langsam. Selbst unter Konditionen, die gewöhnlich für eine vollständige Proteolyse ausreichen (16 h Inkubation, Peptid zu Proteaseverhältnis von 1 : 100 (w/w)), wird ein großer Teil des Eduktes nicht degradiert (Abb. 4.4). In entsprechenden Experimenten zeigt sich der C-Terminus von HNP-2 ebenfalls resistent gegen eine chymotryptische Verdauung.

4.1.5 Isolierung und Reinigung von nativem hBD-1

Zur Charakterisierung des natürlichen hBD-1 muss natives Material benutzt werden. Als Quelle dienen Hämofiltrat und Urin. Die Isolierung von hBD-1 aus den entsprechenden Fraktionen der Peptidbank bis zum homogenen Peptid erfolgt routinemäßig über drei weitere chromatographische Trennschritte.

In der nachfolgenden Grafik ist die Isolierung der β -Defensin-Variante hBD-1-(L₂₅-K₆₈) aus Urin beispielhaft dargestellt (Abb. 4.5 A - D). 10 l Urin von gesunden erwachsenen Spendern (Alter: 23 - 58 Jahre) ist gepoolt, auf pH 2,5 eingestellt und filtriert. Das Filtrat wird mittels Kationenaustausch-Chromatographie (Fractogel TSK SP 650 (M), 10 x 125 mm, Merck, Darmstadt) in 7 Fraktionen (pH-Pools) getrennt. (A) Pool 7 wird auf einer RP-C4-Säule mit einem linearen Gradienten von 2 % B/min fraktioniert. Solventsystem: Puffer A = 0,1 % TFA in Wasser. Puffer B = 80 % Acetonitril, 0,1 % TFA. β -Defensin-haltige Fraktionen können mittels MALDI/ESI-MS identifiziert und individuell gepoolt werden. (B) Für die MALDI-MS wird 1 μ l Eluat mit α -Cyano-4-hydroxycimtsäure als Matrixsubstanz appliziert. (C) Rechromatographie von Fraktion 32 mittels RP-C18-Säule mit einer Flussrate von 0,7 ml/min und einem linearen Gradienten von 0,5 % B/min von 25 % auf 45 % B. hBD-1-(L₂₅-K₆₈) eluiert bei ca. 37 % B (Fraktion 5). (D) Die markierte Fraktion wird abschließend auf einer RP-C18-Säule mit sehr feinem Trägermaterial (120 Å, 5 μ m) gereinigt. Die Fraktionen von Elutionszeit 23 bis 25 werden vereinigt, die Reinheit durch Kapillarzonen-Elektrophorese bestätigt (siehe Einsatz) und mittels Aminosäureanalyse auf Ihre Identität geprüft.

Eine Präparation aus 10 l Urin ergibt eine Ausbeute von **136 μ g hBD-1-(L₂₅-K₆₈)** mit einer Reinheit von ca. 95 %.

Aus 10.000 l Hämofiltrat werden **2,4 mg hBD-1-(D₃₃-K₆₈)** und **1,2 mg hBD-1-(N₃₆-K₆₈)** mit einer Reinheit von > 85 % gewonnen.

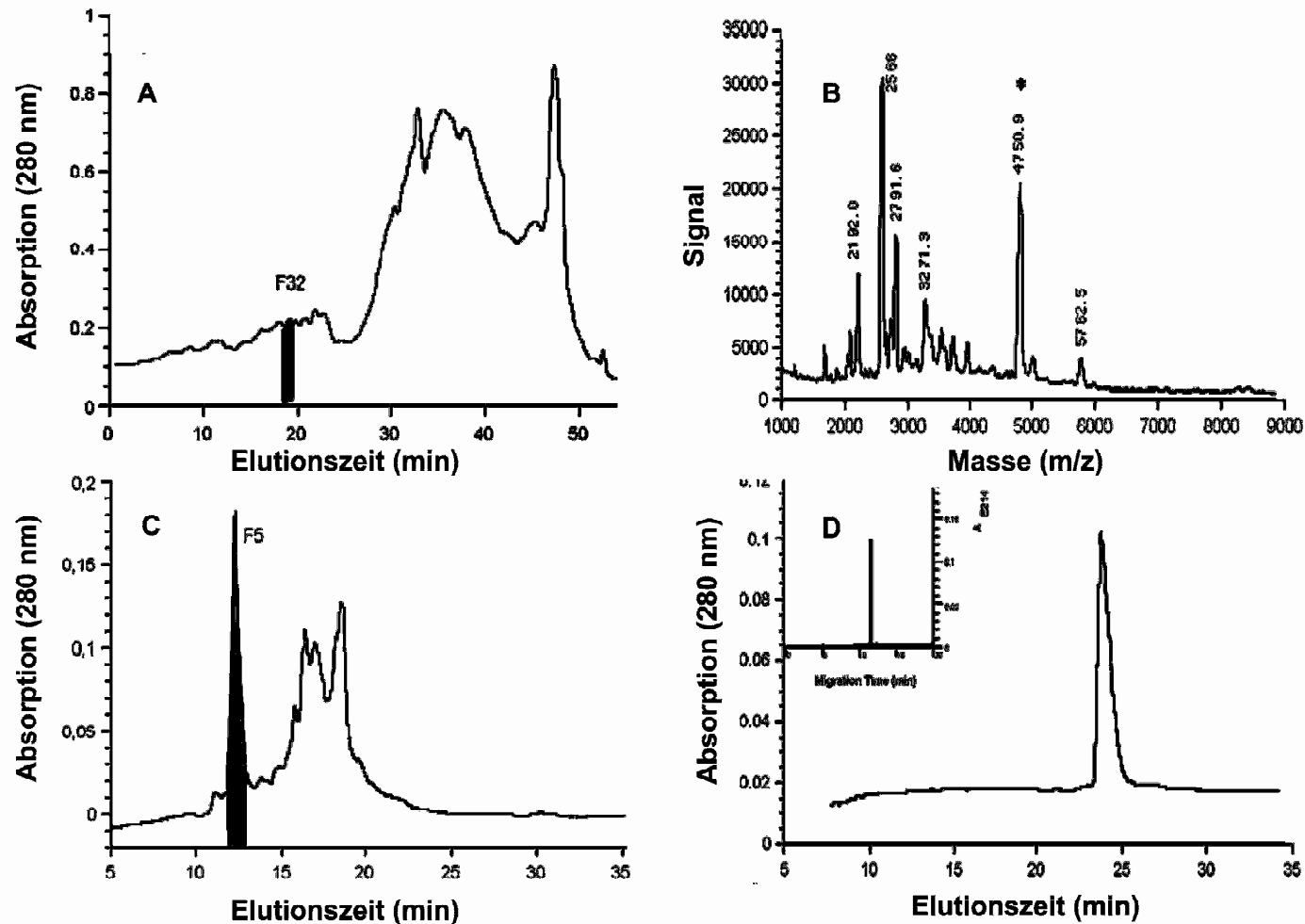


Abb. 4.5: Isolierung von hBD-1-(L₂₅-K₆₈) aus humanem Urin.

(A) Erster Reinigungsschritt auf einer RP-C4-Säule.

(B) MALDI-MS von Fraktion 32: Das Signal für hBD-1-(L₂₅-K₆₈) ist mit einem Stern markiert.

Ordinate: Ratio von relativer Masse und Ladung (m/z).

(C) Rechromatographie von Fraktion 32 mit einer RP-C18-Säule. hBD-1-(L₂₅-K₆₈) eluiert bei ungefähr 37 % B (Fraktion 5).

(D) Abschließender Reinigungsschritt mit einer RP-C18 Säule. Die Fraktionen der Elutionszeit von 23 bis 25 min werden gepoolt und mittels CZE auf Reinheit (siehe Einsatz) und mittels Aminosäureanalyse auf Ihre Identität geprüft.

4.2 Nachweis der antimikrobiellen Aktivität von hBD-1

4.2.1 Antibiotisches Wirkungsspektrum

Um festzustellen, welche Mikroorganismen durch hBD-1 in ihrem Wachstum gehemmt werden, wurde die antimikrobielle Aktivität gegen unterschiedliche Bakteriengruppen und Hefen im Radialdiffusionstest geprüft. Zur Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften von drei isolierten hBD-1-Varianten wurden aerobe Mikroorganismen verschiedener taxonomischer Familien genutzt. Getestet wurden:

Mycetaceae	(<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhodotorula rubra</i>)
Bacillaceae	(<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> ; Gram-positive Stäbchen)
Pseudomonadaceae	(<i>Pseudomonas fluorescens</i> ; Gram-negative Stäbchen)
Enterobacteriaceae	(<i>Escherichia coli</i> ; Gram-negative Stäbchen)
Nesseriaceae	(<i>Neisseria cinerea</i> ; Gram-negative Kokken)
Micrococcaceae	(<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> ; Gram-positive Kokken)

Als antimikrobielle Referenzpeptide werden HNP-2, Magainin-II und Casocidin-I eingesetzt. Abbildung 4.6 zeigt das typische Bild eines Radial-Diffusionshemmtests.



Abb. 4.6: Radial-Diffusionshemmtest von antimikrobiellen Peptiden gegen *Bacillus subtilis*. Die hellen Hemmhöfe lassen die antimikrobielle Wirkung der Peptide erkennen. Es sind folgende Peptide getestet: Im Uhrzeigersinn ab (A) 10 µg hBD-1-(D₃₃-K₆₈); 10 µg hBD-1-(N₃₆-K₆₈); Magainin-II 1, 3, 5 µg; Casocidin-I 1, 5, 10 µg; κ-Casocidin 1, 5, 10 µg.

Von den 11 getesteten Mikroben inhibieren die hBD-1-Varianten nur das Wachstum von *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus carnosus* so effektiv wie die Referenzpeptide Magainin-II und κ-Casocidin. Gegen die anderen getesteten Mikroorganismen ist das Inhibitionspotential der Referenzpeptide ca. 10-fach größer als das

der β -Defensinvarianten. Auch das antimikrobielle Potential von HNP-2 ist deutlich höher, wenngleich HNP-2, wie auch hBD-1, nicht das Wachstum von allen getesteten Mikroben inhibiert (Tabelle III).

Ein Vergleich der längsten Variante hBD-1-(L₂₅-K₆₈) mit der kürzesten Variante hBD-1-(N₃₆-K₆₈) ergibt keinen erkennbaren Unterschied in der antimikrobiellen Aktivität. Die Variante mittlerer Länge hBD-1-(D₃₃-K₆₈) ist bedeutend weniger aktiv gegen Bacilli und zeigt fast keine Aktivität gegen *Staphylococcus carnosus* (Abb. 4.7).

Weitere Tests mit den Peptidvarianten hBD-1-(D₃₃-K₆₈) und hBD-1-(N₃₆-K₆₈) zeigen eine schwache (kleiner als 10 U/10 μ g) Wachstumsinhibition von *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus*, *Neisseria cinerea*, *Escherichia coli* K12 und *Pseudomonas fluorescens*. Keine Inhibition wird bei *Rhodotorula rubra*, *Escherichia coli* BL 21 und *Staphylococcus epidermidis* gesehen (Tabelle III).

Tabelle III: Antimikrobielles Wirkungsspektrum von hBD-1 und HNP-2 gegen verschiedene Mikroorganismen unter „Standardbedingungen“ (Abschnitt 3.1.1 / 3.5.2).

Stamm	hBD-1 (N ₃₆ -K ₆₈)	hBD-1 (D ₃₃ -K ₆₈)	hBD-1 (L ₂₅ -K ₆₈)	HNP-2 (1 μ g)	Membran
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++	++	n.g.	+++	Hefe
<i>Rhodotorula rubra</i>	-	-	n.g.	+	Hefe
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	++	+++	+++	Gram +
<i>Bacillus megaterium</i>	+++	+++	+++	+++	Gram +
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	++	n.g.	-	Gram -
<i>Escherichia coli</i> K12	+	++	+	-	Gram -
<i>Escherichia coli</i> BL 21	-	-	n.g.	+	Gram -
<i>Neisseria cinerea</i>	++	+	n.g.	+++	Gram -
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	n.g.	-	Gram +
<i>Staphylococcus carnosus</i>	+++	+	+++	+++	Gram +
<i>Micrococcus luteus</i>	n.g.	++	n.g.	+++	Gram +

Es wurden jeweils 10 μ g hBD-1 eingesetzt. Einteilung der Wachstumsinhibition: n.g., nicht getestet; -, keine Inhibition; +, schwache Inhibition < 5 U; ++, moderate Inhibition 5 - 10 U; +++, starke Inhibition > 10 U

4.2.2 Inhibition der antibakteriellen Aktivität von hBD-1 durch Salz

Die beobachtete antimikrobielle Aktivität aller getesteten molekularen Varianten von hBD-1 wird bei *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus carnosus* und *Escherichia coli* K12 durch Zusatz von 100 mM NaCl zu den Testplatten vollständig aufgehoben (Abb. 4.7, links)

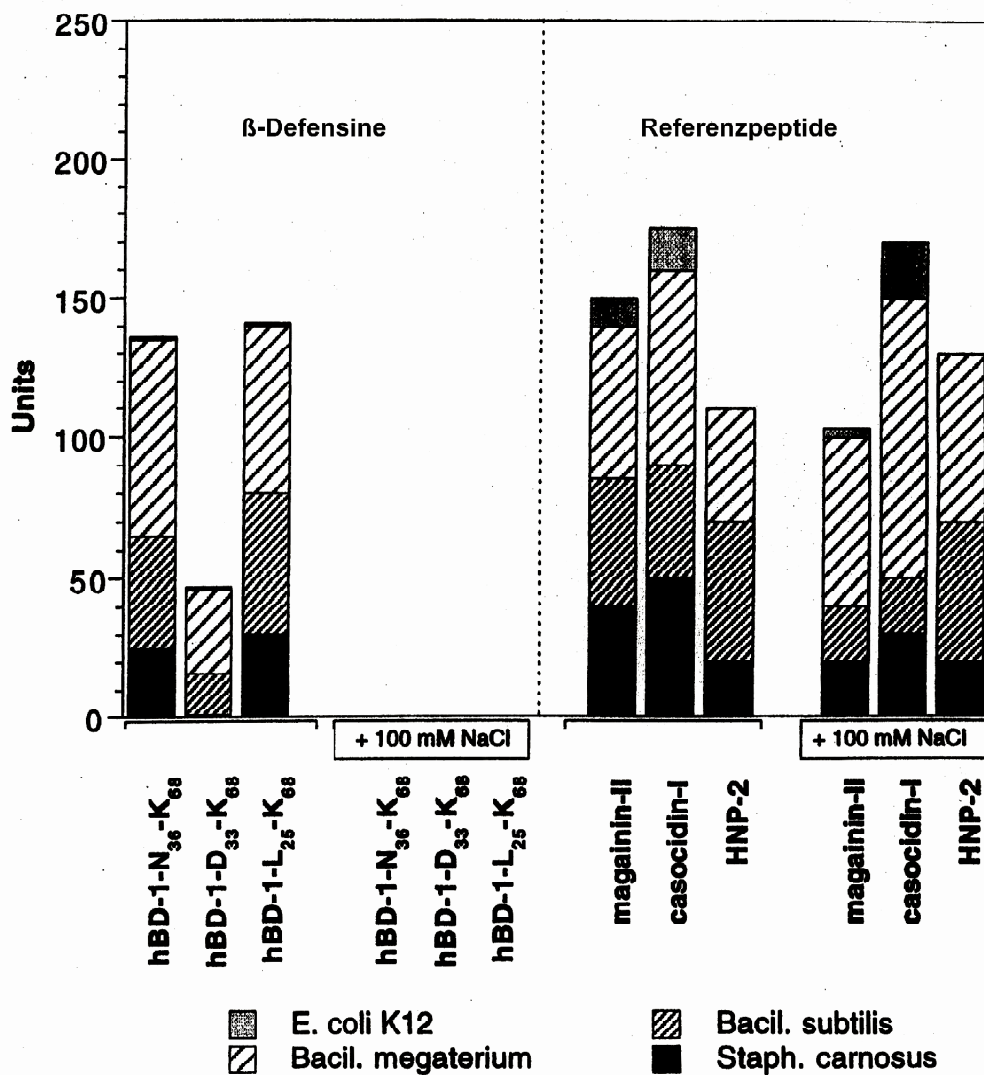


Abb. 4.7: Vergleich der antimikrobiellen Potenz und Salzeempfindlichkeit verschiedener antibiotischer Peptide gegen 4 getestete Stämme. Die gestapelten Säulen geben die antimikrobielle Aktivität von 10 µg Peptid (1 µg für HNP-2!) an, die im Radial-Diffusionstest bestimmt wurde. Die Platten wurden mit 100 mM NaCl supplementiert oder nicht. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von 3 Experimenten.

Im Gegensatz dazu wird die antimikrobielle Aktivität des α -Defensins HNP-2 und der linearen Peptide Magainin-II und Casocidin-I nicht inhibiert, wenngleich die Experimente tendenziell zeigen, dass die antimikrobielle Potenz dieser Peptide durch den Salzgehalt des Mediums moduliert werden kann. So ist z.B. die antibiotische Wirkung von Casocidin-I in salzhaltigem Medium gegen *Escherichia.coli* K12 und *Bacillus subtilis* abgeschwächt, wohingegen das Wachstum von *Bacillus megaterium* stärker inhibiert wird (Abb. 4.7).

4.2.3 Modulation der antibakteriellen Aktivität von hBD-1 durch den pH

hBD-1 liegt in Geweben und Mikrokompartimenten mit sehr unterschiedlichem pH-Wert und unterschiedlichen lokalen Konzentrationen vor. Deshalb haben wir den Einfluss des Medium-pH auf die antibakterielle Potenz von hBD-1-(D₃₆-K₆₈) an vier Stämmen, die durch diese Variante im Wachstum inhibiert werden, getestet.

Die antimikrobielle Aktivität von hBD-1 wird durch den pH-Wert des Mediums moduliert. Bei drei getesteten Keimen ist die antimikrobielle Aktivität bei Ansäuern des Plattenmediums (pH 6,2) erhöht. Im Gegensatz dazu ist das Wachstum von *Micrococcus luteus* effektiver im neutralen Milieu (pH 7,2) gehemmt.

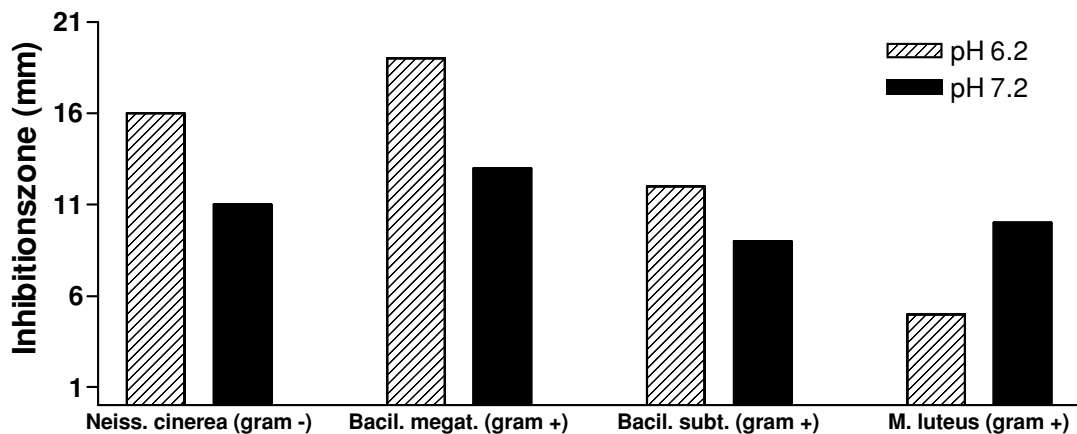


Abb. 4.8: Modulation der antimikrobiellen Potenz von hBD-1-(D₃₆-K₆₈) durch den pH. Die Säulen geben die im Radial-Diffusionstest bestimmte antimikrobielle Aktivität von 10 μ g Peptid an. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von 2 Experimenten.

4.3 Einfluss von hBD-1 auf höhere Eukaryoten

Endogene Peptidantibiotika dienen höheren Eukaryoten zur Abwehr von Prokaryoten. Bei Säugern werden Defensine exprimiert, ohne die Wirtszellen selbst zu schädigen. Dennoch wird in einzelnen Fällen beobachtet, dass sich das antibiotische Potential von Defensinen gelegentlich auf niedrigere Eukaryoten (Hefen; siehe Tabelle III) und auf Säugerzellen erstreckt. So zeigen α -Defensine eine unspezifische zytotoxische Aktivität gegen eine Reihe von normalen und malignen Zellen, einschließlich Zellen, die resistent gegen TNF- α und NKCF (natural killer cytotoxic factor) sind [Lehrer *et al.*, 1993].

Der Einfluss von hBD-1 auf das Wachstum von Säugerzellen wurde getestet. Dazu dienten (1) die Maus-Zelllinie NIH-3T3, ein kontakt-inhibierter, adhären wachsender Fibroblasten-Zelltyp, (2) die monozytenähnliche humane Zelllinie THP-1 und (3) die humane Darmepithelzelllinie T 84. In einem kolometrischen Test (WST-1-Test) wurde die Zellproliferation analysiert.

Grundsätzlich hat hBD-1 keinen (THP-1, T 84) oder nur einen sehr geringen (NIH-3T3; Passage 38!) Einfluss auf die Überlebensrate der untersuchten Zelllinien.

Bei NIH-3T3-Fibroblasten kann aber unter dem Einfluss von hBD-1 eine tendenzielle, wenn auch statistisch nicht signifikante Abnahme der Überlebensrate beobachtet werden. Bezogen auf die ohne Zusatz von hBD-1 kultivierten Zellen (Überlebensrate definiert als 100 %) führten bei „jungen“ NIH-3T3-Fibroblasten erst hohe hBD-1-Konzentrationen (> 10 μ g/ml) und lange Inkubationszeiten (> 48 h) zu einer um ca. 15 % erhöhten Zunahme der Zellsterblichkeit (Daten nicht gezeigt).

Eine signifikante Abnahme der Überlebensfähigkeit von NIH-3T3-Zellen zeigt sich erst bei Verwendung einer Zellcharge mit hoher Passagezahl (> 180 Passagen), obwohl die unbehandelten Zellen dieser Passagen im Vergleich zu den Zellen mit niedriger Passagezahl lichtmikroskopisch keine Auffälligkeiten zeigen.

Das Wachstum dieser Zellen wird sowohl durch hBD-1-(D₃₃-K₆₈) als auch hBD-1-(N₃₆-K₆₈) dosisabhängig inhibiert (Abb. 4.9 A).

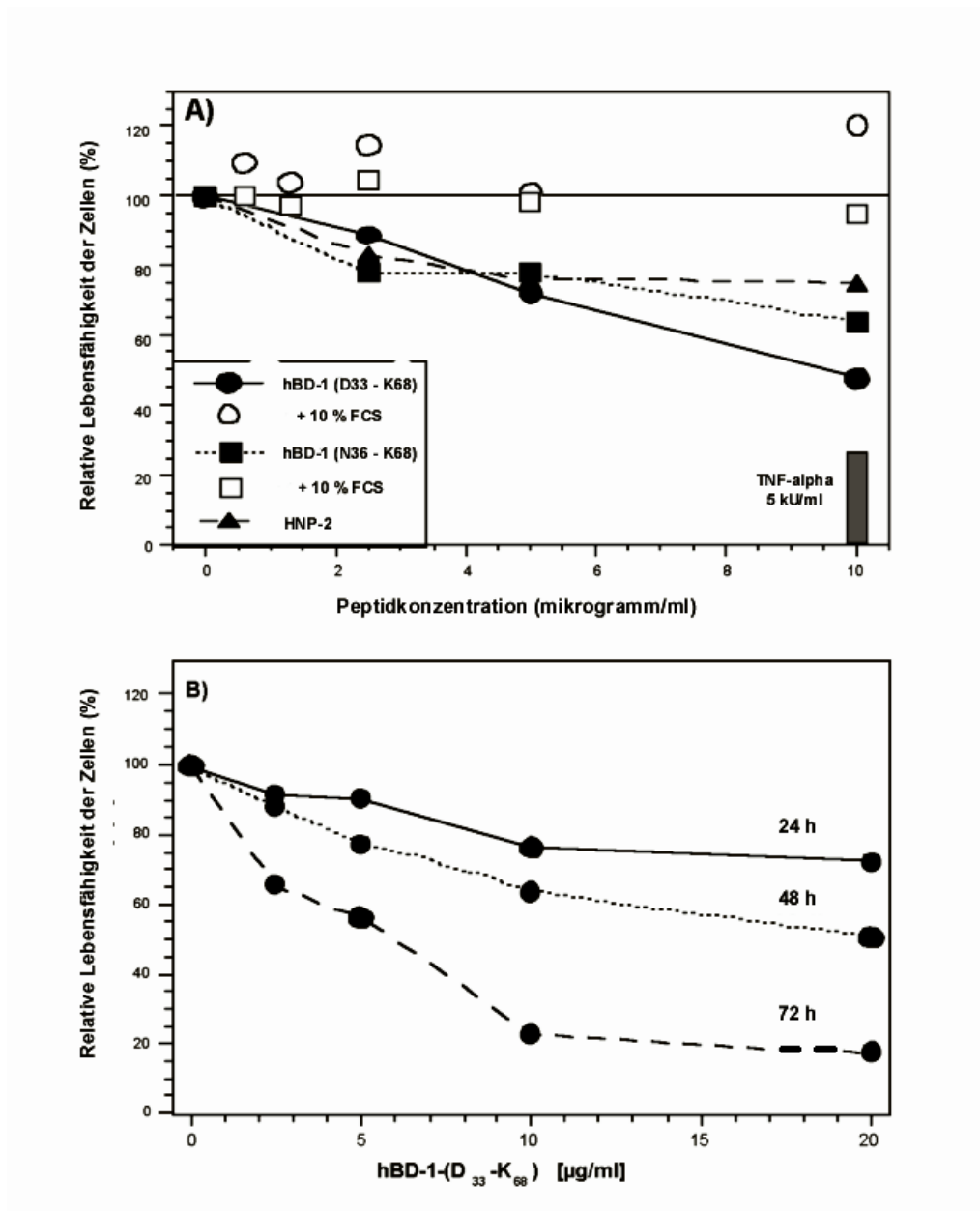


Abb. 4.9: Bestimmung der Lebensfähigkeit von NIH-3T3-Zellen in Gegenwart von Defensinen mittels eines kolometrischen Tests. (A) Zytotoxizitätsprofil der β -Defensin-Varianten hBD-1-(D₃₃-K₆₈) und hBD-1-(N₃₆-K₆₈) sowie für das α -Defensin HNP-2. Leere Symbole indizieren die Inkubation in Gegenwart von 10 % FCS. Humanes rekombinantes TNF- α dient als Kontrollsubstanz. Die Extinktion wird nach 48 Stunden Inkubationszeit mit oder ohne Defensin mit 0,1 % FCS im Medium gemessen. Die von den unbehandelten Kontrollzellen erhaltenen Werte werden als 100 % Lebensfähigkeit definiert. Alle Datenpunkte sind die Mittelwerte aus zwei jeweils im Triplikat durchgeführten Experimenten. (B) Dosis-Wirkungs-Profil von hBD-1-(D₃₃-K₆₈) nach drei verschiedenen Inkubationszeiten.

Die Aktivität von hBD-1-(D₃₃-K₆₈) ist abhängig von der Inkubationszeit. Bei einer Peptidkonzentration von 20 µg/ml führt eine Inkubation für 24 h zu einer Reduktion der Zell-Lebensfähigkeit auf etwa 75 %, wogegen nach einer Langzeitinkubation über 72 h nur 20 % Lebensfähigkeit verbleiben (Abb. 4.9 B).

Der inhibitorische Effekt auf die Zellen wird nur bei niedrigen Serumkonzentrationen (0,1 % FCS) beobachtet (Abb. 4.9 A).

Die mikroskopische Analyse der Zellen eröffnete signifikante Veränderungen in der Zellmorphologie. hBD-1 induziert eine Formation von dichten Zellkernen und führt zu einem stark reduzierten, basophilen Zytoplasma (Abb. 4.10).

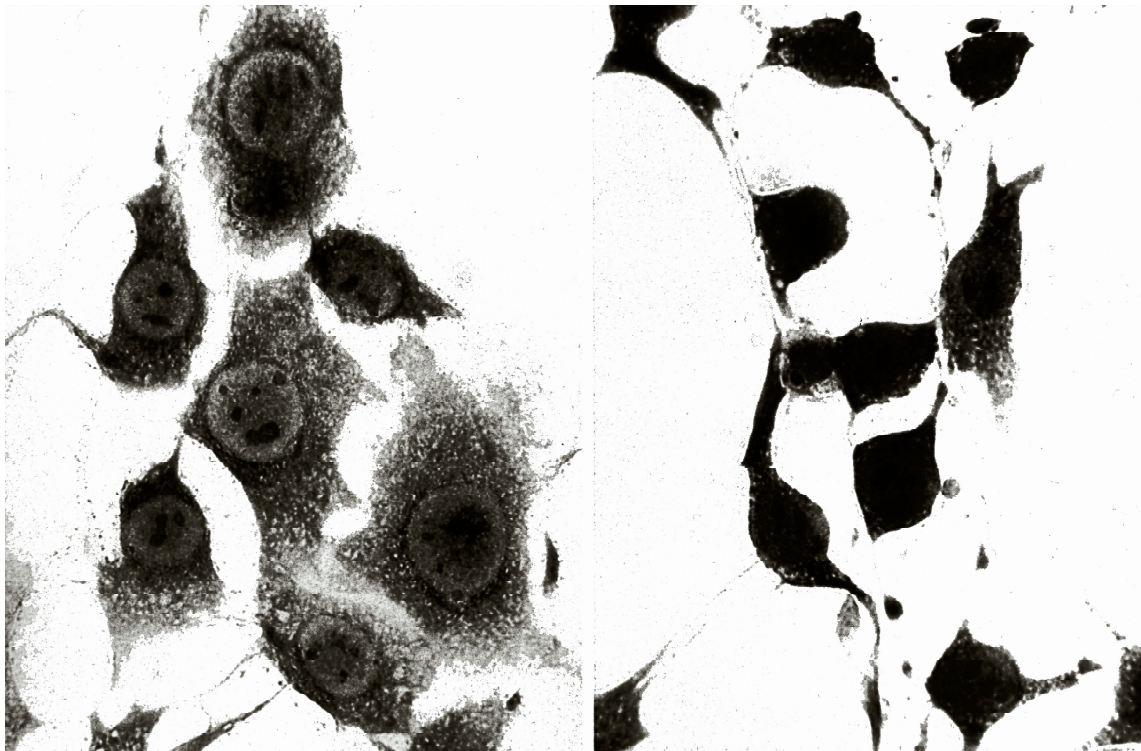


Abb. 4.10: Einfluss von β -Defensin-1 auf NIH-3T3-Mausfibroblasten. Mikroskopische Aufnahme von NIH-3T3-Zellen. Färbung mit GIEMSA. Vergrößerung 200 x. Die Zellen werden auf Glasplättchen in DMEM mit 0,1 % FCS kultiviert. LINKS: Unbehandelte Zellen. RECHTS: Die Zellen wurden mit 20 µg hBD-1/ml Medium für 48 Stunden inkubiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass hBD-1 im Allgemeinen keinen schädigenden Einfluss auf Säugerzellen ausübt. Primär beeinflusst hBD-1 das Wachstum von Prokaryoten. Andererseits weisen die Resultate darauf hin, dass „unphysiologisch“ hohe hBD-1-Konzentrationen bei längerer Einwirkung auch die Wirtszellen schädigen können. Die höhere Anfälligkeit von Zellen, die bereits eine große Anzahl von Zellzyklen absolviert haben, deuten an, dass eine mögliche antibiotische Wirkung von hBD-1 auf Säugerzellen, ähnlich den antimikrobiellen Eigenschaften (Abschnitt 4.2), auch von dem Zustand, d.h. der Fitness dieser Zellen abhängt.¹

Der Einfluss von hBD-1 auf Eukaryoten im Detail muss in weiteren Studien aufgeklärt werden, wenn ausreichende Ressourcen zur Durchführung entsprechender Experimente zur Verfügung stehen. Insbesondere die Aufklärung der tatsächlichen Wirkungsmechanismen von hBD-1 auf Membranen wird neue Möglichkeiten für weitere Experimente zur funktionellen Charakterisierung dieses Peptids eröffnen.

¹ **Persönliche Stellungnahme:** Die „cytotoxische Aktivität“ auf NIH-3T3-Mausfibroblasten wird vom Betreuer, Herrn Prof. W. G. Forssmann, als fragwürdig bezeichnet. Diese von Herrn J. Grabowsky und Herrn Dr. H. D. Zucht erhaltenen Ergebnisse sollten wegen der Bedeutung für einen solchen Effekt ausführlicher bearbeitet werden. Wegen Ausscheidens von Herrn Dr. H. D. Zucht aus dem Institut, wurde dieses Projekt, dessen Ergebnisse im Eur J Med Res 3 (7), 315-323 (1998) publiziert sind, nicht weitergeführt. Für diese im Eur J Med Res und in dieser Arbeit publizierten Anteile der Arbeit übernimmt Herr Prof. W.G. Forssmann keine Verantwortung.

4.4 Expression von β -Defensin-1-mRNA

Eine Voraussetzung zur Aufklärung der Funktion des hBD-1 ist die Kenntnis der exakten Expressionsorte auf Gewebe- und Zellebene. Zur Lokalisation der hBD-1-Expression wurden daher RT-PCR-Experimente mit humanen Geweben und Zelllinien durchgeführt.

Es zeigt sich, dass hBD-1 nicht nur, wie bereits bekannt, in der Lunge, den äußeren Atemorganen oder dem Genitaltrakt exprimiert wird. In nahezu allen bisher untersuchten sekretorisch-epithelialen Geweben wie Parotis, Speicheldrüsen, Trachea, Lunge, Pankreas, Leber, Niere, Prostata, Placenta, Vagina, Darm und Harnblase kann die spezifische mRNA für hBD-1 nachgewiesen werden. Interessanterweise wird eine hBD-1-Expression in Magen, Milz, Gehirn und Testis nicht gezeigt.

Von den untersuchten humanen Zelllinien exprimieren IHKE-Zellen (eine Nierenzelllinie aus immortalisierten distalen Tubuluszellen) sowie die monozytenähnlichen Linien U 937 (DSM ACC 5) und THP-1 (DSM ACC 16) hBD-1-mRNA. Im Gegensatz zu den letztgenannten Zelllinien können in den aus Vollblut isolierten primären Leukozyten keine hBD-1-spezifischen Transkripte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

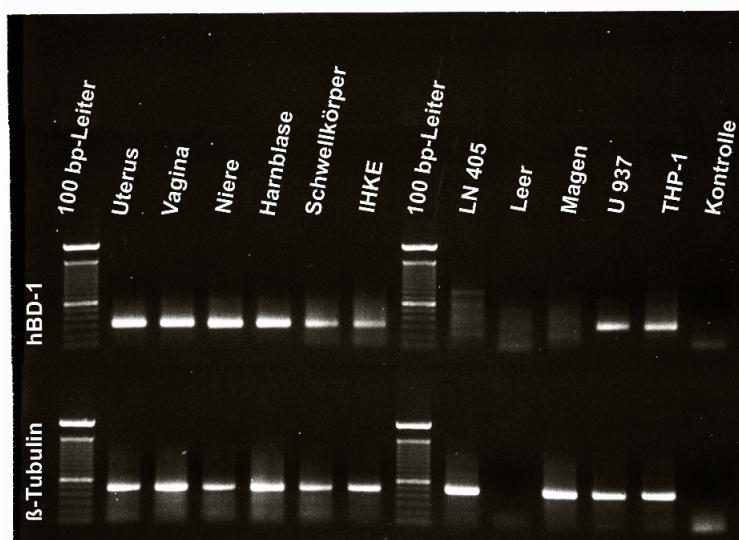


Abb. 4.11: RT-PCR-Analyse von hBD-1-Transkripten im humanen Urogenitaltrakt und diversen Zelllinien. Gesamt RNA aus humanen Geweben und Zellkulturen wurde mit dem RNeasy Total RNA Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert und mittels Reverser Transkriptase (Superscript II, Gibco BRL, Eggenstein) in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation von hBD-1-Transkripten wurde mit Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Amplifikationsbedingungen: Pre-PCR: 94° C für 5 min, 55° C für 5 min, 72° C für 0,5 min; PCR: 94° C für 0,1 min, dann **35 Zyklen** von 94° C für 0,5 min, 55° C für 0,5 min, 72° C für 0,5 min mit einer finalen Elongation von 72° C für 7 min.

Die verwendeten Primer führten zu

einem Amplikon von 298 Basenpaaren.

hBD-1-F1: 5'-CCATGAGAACTTCCTACCTTCTGC-3';

hBD-1-R1: 5'-CCAAGTGCTGCAAGTGAG-3'.

bp = Basenpaare; IHKE = immortalized human kidney epithelial cell line; THP-1 und U 937 = Monozyten-ähnliche Zelllinien; LN 405 = Astrozyten-ähnliche Zelllinie. Kontrolle = Reaktionsansatz ohne Template. Zur Kontrolle der Erststrangsynthese wurde von jedem cDNA-Erststrang eine PCR mit spezifischen Primern für das ubiquitäre β -Tubulin durchgeführt.

Im Allgemeinen ist die hBD-1-Expression in den untersuchten Proben sehr niedrig. Zur detektierbaren Amplifikation spezifischer cDNA werden grundsätzlich 35 - 40 Zyklen notwendig. Die extrahierbare RNA-Menge reicht in der Regel nicht aus, um die hBD-1-Expression einer weiteren, auch quantitativen Analyse z.B. mittels Northern-Blot zugänglich zu machen. Eine Ausnahme bildet Gewebe aus humanen Bauchspeicheldrüsen (siehe Abschnitt 4.8).

Tabelle III gibt eine aus eigenen Beobachtungen und Literaturdaten zusammengestellte Übersicht über β -Defensin-1-exprimierende Organe und Zellen im Menschen.

Tabelle III: β -Defensin-1-Transkripte (RT-PCR) in humanen Organen

Verschiedenes		Urogenitaltrakt		Gastrointestinaltrakt	
Lunge ^{#, 2, 4, 5, 6}	+	Niere ^{#, 1, 6}	++	Speicheldrüsen ^{4, 6}	+
Haut ^{#, 3}	?	Harnblase	(+)	Magen ^{#, 6}	-
Herzmuskel ⁶	(+)	Testis ⁶	-	Pankreas ^{#, 6}	++
Brustdrüse ⁶	+	Prostata ⁶	+	Leber ^{#, 6}	+
Thymus ⁶	(+)	Harnröhre ^{#, 6}	+	Darm ^{#, 6}	+
Gehirn ^{#, 6}	-	Schwellkörper [#]	+	-Duodenum	?
Knochenmark ⁶	-	Uterus ^{#, 1}	+	-Jejunum	(+)
Leukozyten ^{#, 6}	-	Vagina ^{#, 1, 6}	+	-Ileum	(+)
Makrophagen ⁴	+	IHKE [#]	+	-Caecum	(+)
Epithelzellen ^{4, 6}	(+)	HEK-293EBNA [#]	-	-Kolon	+
SNB 60/LN 405 [#]	-			-Rektum	(+)
THP-1/U 937 [#]	+			Intestinale Mastzellen [#]	-

- = Expression negativ; (?) = Expression fraglich; (+) = schwache Expression; + = Expression positiv; ++ = starke Expression; IHKE = immortalized human kidney epithelial cell line; THP-1 und U 937 = Monozyten-ähnliche Zelllinien; HEK-293EBNA = human embryonal kidney cells; LN 405 and SNB 60 = Astrozyten-ähnliche Zelllinie. # = eigene Beobachtungen. Zitierte Veröffentlichungen: 1. Bensch, K.W., Raida, M., Mägert, H.J., Schulz-Knappe, P., Forssmann, W.G.: hBD-1: A novel beta-defensin from human plasma. FEBS Lett. **368**: 331-335 (1995); 2. Goldmann, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Prasad Kari, U., Zasloff, M., Wilson, J.M.: Human beta-Defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell **88**: 553-560 (1997); 3. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder J.M.: A peptide antibiotic from human skin. Nature **387**: 861 (1997); 4. McCray, P.B. Jr., Bentley, L.: Human airway epithelia express a beta-defensin. Am J Respir Cell Mol Biol **16** (3): 343-349 (1997); 5. Soong, L.B., Ganz, T., Ellison, A., Caughey, G.H.: Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. Inflamm. Res. **46**: 98-102 (1997); 6. Zhao, C., Wang, I., Lehrer, R.I.: Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. FEBS Lett. **369**: 319-322 (1996)

4.5 Lokalisation der hBD-1-Expression in der Niere

Die starke, hervorstechende Expression von hBD-1 in der Niere sowie die relativ hohe Konzentration des korrespondierenden Peptids im Urin lassen eine besondere Bedeutung im Urogenitaltrakt vermuten. Deshalb wurde in Gewebeschnitten einer humanen Niere der Expressionsort des hBD-1 mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung genauer bestimmt.

Diese Analyse zeigt, dass die renale Expression von hBD-1 hauptsächlich in Zellen der distalen Tubuli lokalisiert ist (Abb. 4.12).

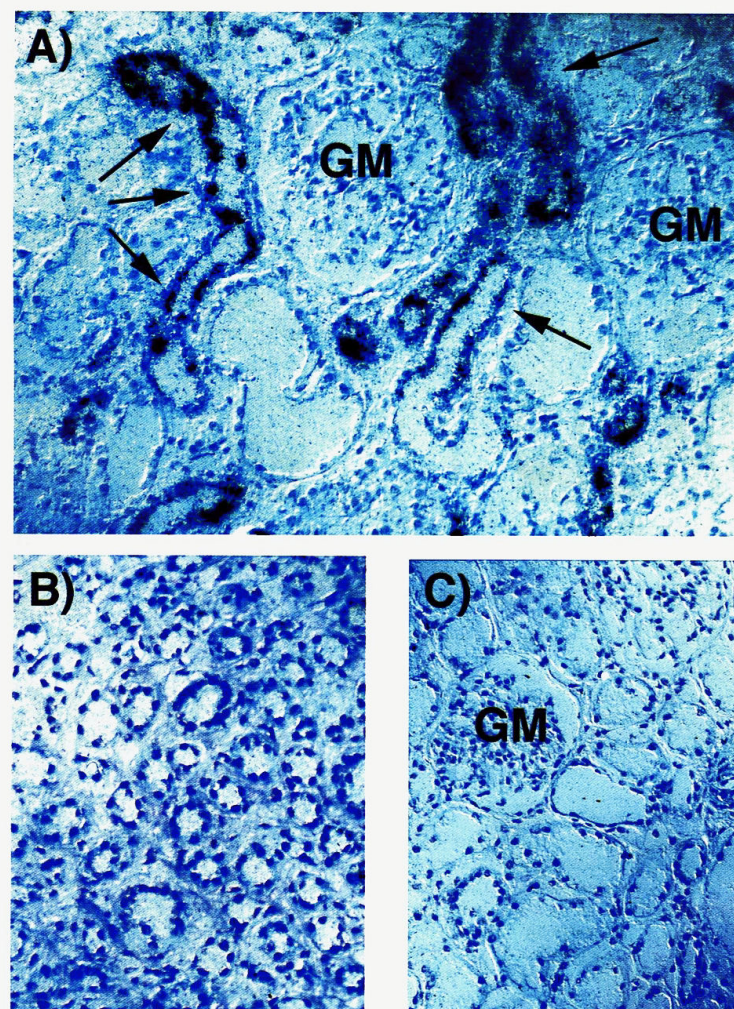


Abb. 4.12: Lokalisation von β -Defensin-1 in der Niere mittels *In-situ*-Hybridisierung von hBD-1-Transkripten. (A) Autoradiographie eines Gefrierschnittes von einer humanen Niere hybridisiert mit Antisense-³⁵S-UTP markierter hBD-1-spezifischer Ribonukleinsonde. Gegenfärbung: GIEMSA; Vergrößerung: 1000 x. Das Transkript ist lokalisiert in Epithelzellen des distalen Tubulus und der Verbindungsstücke (sichtbar als schwarze Körnung, Pfeile). In den Glomeruli (GM) oder in der Medulla (Abb. B) konnte keine Expression detektiert werden. Kontrollschnitte hybridisiert mit Sense-RNA-Proben zeigten keine Signale (C).

4.6 Immunisierung zur Herstellung von anti-hBD-1-Antikörpern

Eine Voraussetzung zur Charakterisierung einer biogenen Substanz ist die Klärung ihrer Herkunft und ihrer Lokalisation im Organismus. Die Kenntnis der Wirkungsorte *in vivo* ermöglichen den Aufbau adäquater *In-vitro*-Experimente zur weiteren Aufklärung ihrer Funktion(en). Spezifische Antikörper bilden eine wesentliche Grundlage für Verfahren von qualitativen und quantitativen Methoden zur Detektion eines Peptides in biologischen Systemen.

Die generell geläufige Herstellung von spezifischen Antisera in Kaninchen mit nativem hBD-1 als Antigen wurde aufgrund des hohen Bedarfs (mg) an Antigen nicht angewendet. Verschiedene Immunisierungen von Kaninchen mit synthetischem hBD-1 führten nicht zu einem spezifischen Antiserum.

Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Antikörper wurden Mäuse mit nativem hBD-1 über einen Zeitraum von 18 Tagen immunisiert. Interessanterweise war die Sterberate der Mäuse (3 von 9 Tieren) bei einer längeren Immunisierungsdauer (> 4 Wochen) mit hBD-1 deutlich höher als bei anderen am Institut durchgeführten Immunisierungen. Eine Todesursache konnte nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zu den herkömmlicherweise für Immunisierungen verwendeten Balb-c-Mäusen setzten wir bei diesem Immunisierungsversuch NZBxNZW-(F1)-Mäuse ein. Wie unsere Ergebnisse bestätigen (Abb. 4.13), lassen sich aus Tieren von diesem Stamm in kurzer Zeit auch gegen weniger antigene Peptide bessere Antikörper gewinnen.

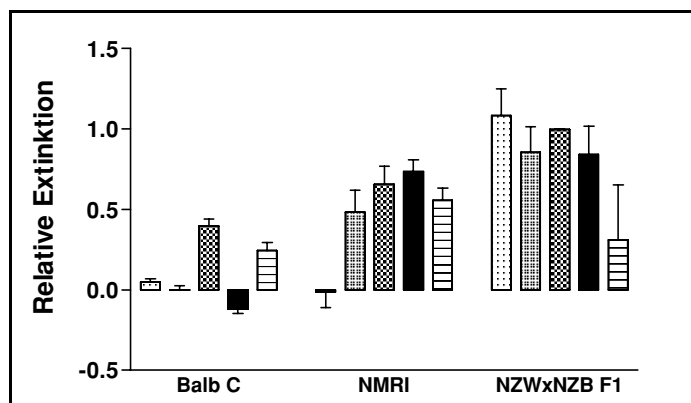


Abb. 4.13: Immunisierung verschiedener Mausstämmen mit nativem hBD-1. Individuelle anti-hBD-1-Titer von jeweils 5 Mäusen verschiedener Stämme. Die Ermittlung des Titers erfolgte im ELISA. Antigen: synthetisches hBD-1-(D₃₃-K₆₈). Anti-Serumverdünnung 1 : 1.000. Die dargestellten Extinktionswerte

(Mittelwert +/- SEM von 3 Messungen) wurden auf die individuellen Basiswerte (T₀) normiert.

Die Seren der NZWxNZB-Mäuse ergaben nach Abschluss der 18tägigen Immunisierung die höchsten hBD-1-Titer. Die Anzahl der eindeutig immunreaktiven Tiere war mit 80 % (4 von 5 Tieren) fast dreimal so hoch wie bei den Balb-c-Mäusen.

Pro Maus konnte durch die finale Blutentnahme 0,5 - 1 ml anti-hBD-1-Serum gewonnen werden. Im Testsystem ELISA erreichten die Antiseren Titer von 1 : 1.000 bis 1 : 2.000. Die in Abbildung 4.14 dargestellte Entwicklung des anti-hBD-1-Titers sowie die exemplarisch gezeigte Abnahme der Klasse M Immunglobuline weisen auf eine spezifisch gegen hBD-1 gerichtete Immunantwort hin.

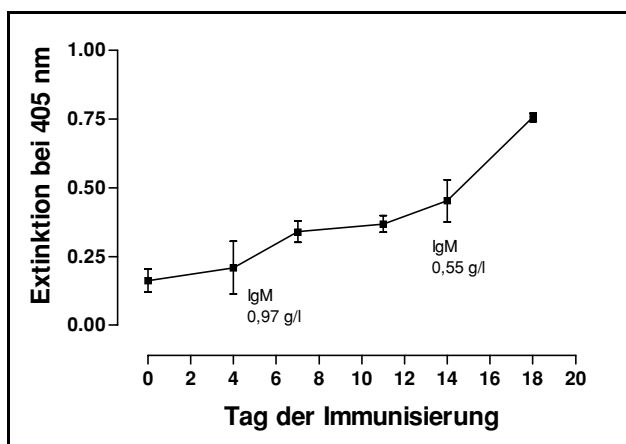


Abb. 4.14: Immunisierung von NZBxNZW-Mäusen mit nativem hBD-1. Entwicklung des anti-hBD-1-Titers während der Immunisierungsphase. Die Ermittlung des Titers erfolgte im ELISA. Antigen: synthetisches hBD-1-(D₃₃-K₆₈). Anti-Serumverdünnung 1 : 1.000. Alle Messungen erfolgten im Triplikate. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von 3 Tieren. IgM, Immunglobulin M. Bei einem Tier wurde in 2 Serumproben (Tag 4 und Tag 14) die

IgM-Konzentration mittels eines nephelometrischen Messverfahrens mit einem Behring Nephelometer Analyser BNA 200 gemäss den Instruktionen des Herstellers (Behringwerke AG) bestimmt.

Zur weiteren Bestimmung von Spezifität und Sensitivität wurde das Antiserum in Immunoblotmethoden getestet. Durchgeführt wurden Dotblots mit nativem hBD-1 sowie Western-Blots unter reduzierenden Bedingungen. Die optimale Antiserumverdünnung betrug in diesen Experimenten 1 : 500.

Wie durch die immunhistologischen Daten bestätigt wird (Abschnitt 4.7), ist im Western-Blot keine Kreuzreaktivität mit HNP-2 zu beobachten.

Die untersuchten hBD-1-Varianten hBD-1-(L₂₅-K₆₈), hBD-1-(D₃₃-K₆₈) und hBD-1-(N₃₆-K₆₈) können sowohl unter reduzierenden (Abb. 4.15) als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen detektiert werden (Abb. 4.16).

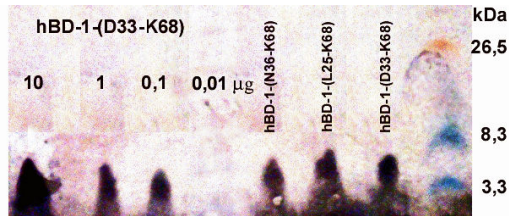
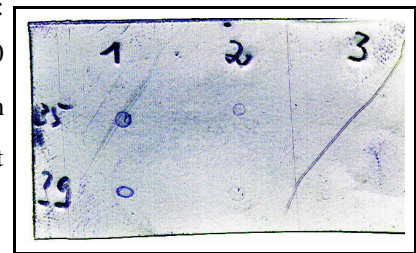


Abb. 4.15: Western-Blot-Analyse von gereinigten hBD-1-Varianten mit Maus-anti-hBD-1-Antiserum. Das Peptid ist auf ein 16,5 % Tris-Trycin-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran transferiert. Immunreaktives Peptid wird nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase konjugiertem IgG mit

Nitrobluetetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat dargestellt. Linke Seite (Bahn 1-4): Serielle Verdünnungsreihe (10 µg - 10 ng) von hBD-1-(D₃₃-K₆₈). Rechte Seite (Bahn 5-7): Drei molekulare Varianten von hBD-1. Aufgetragen ist jeweils 1 µg Peptid. Rechts (Bahn 8): Kaleidoskop Polypeptid Molekulargewicht Standard.

In seriellen Verdünnungsreihen liegt die Nachweisgrenze für hBD-1-(D₃₃-K₆₈) mit dem anti-hBD-1-Antiserum deutlich unter 100 ng und kann mittels Dotblot auf ca. 20 ng abgeschätzt werden (Abb. 4.15 und 4.16).

Abb. 4.16: Dotblot-Analyse von nativem hBD-1. OBEN: hBD-1-(N₃₆-K₆₈); UNTEN: hBD-1-(D₃₃-K₆₈). Aufgetragen sind (1) 200 ng, (2) 20 ng, (3) 2 ng Peptid. Die Visualisierung erfolgt nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase konjugiertem IgG mit Nitrobluetetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat.



Beim Einsatz des anti-hBD-1-Antiserums zum Nachweis des Peptides in Extrakten von Zelllinien, welche hBD-1 exprimieren, sowie in Gesamtproteinpräparationen aus humanen Leukozyten werden keine positiven Ergebnisse erzielt (Abb. 4.17). Auch bei einer immunchemischen Analyse von Zytospin-Präparaten der genannten Zellen ist kein hBD-1-Peptid nachzuweisen (Experimente nicht gezeigt).

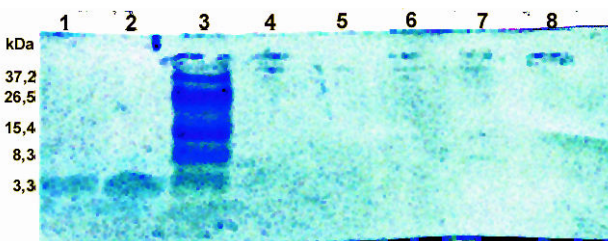


Abb. 4.17: Western-Blot-Analyse von Peptidextrakten aus diversen Zellen. Die Peptide sind auf ein 10 - 20 % Gradienten Tris-Trycin-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran transferiert. Immunreaktives Peptid ist nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase

konjugiertem IgG mit Nitrobluetetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat dargestellt. Bahn 1: 0,1 µg hBD-1-(N₃₆-K₆₈); Bahn 2: 0,1 µg hBD-1-(D₃₃-K₆₈). Bahn 3: Kaleidoskop Polypeptid Molekulargewicht Standard. Bahn 4-8: Jeweils 20 µg Gesamtprotein aus der Extraktion diverser Zellen: (4) THP-1; (5) U937; (6) IHKE; (7 und 8) Extrakte aus der Präparation von humanen Leukozyten.

4.7 Immunologischer Nachweis von β -Defensin-1 in humanem Gewebe

Zur Ermittlung der Synthese- und Speicherorte von Defensinpeptiden wurden mit dem unter 4.6 beschriebenen Maus-anti-hBD-1-Antiserum histochemische Untersuchungen an der Niere, der Leber, dem Dickdarm sowie der Bauchspeicheldrüse durchgeführt. Die Auswahl der Präparate richtete sich nach der ermittelten Expression des hBD-1-Gens (Abschnitt 4.4) sowie nach der Verfügbarkeit von geeigneten Resektaten.

4.7.1 hBD-1-Peptid in Niere und Leber

Analysen der hBD-1-Genexpression weisen auf eine starke Transkription von hBD-1-mRNA in der Leber und insbesondere in der Niere hin. Zudem wird der Urogenitaltrakt als Hauptsyntheseort von hBD-1 diskutiert [Valore *et al.*, 1998; Zucht *et al.*, 1998]. Um das korrespondierende Peptid in diesen Geweben zu lokalisieren, wurden Leber- und Nierenpräparate von jeweils 6 verschiedenen Patienten, die aufgrund schwerer Erkrankungen (Leber- bzw. Nierentumoren) operiert wurden, immunhistologisch untersucht.

Weder in der Niere noch in der Leber ist mit den generierten Antikörpern gegen hBD-1 ein eindeutig spezifisches Signal zu erkennen. Bezüglich der Niere wird dieses Ergebnis von anderen bestätigt [Valore *et al.*, 1998].

4.7.2 hBD-1-Peptid in der Bauchspeicheldrüse

Zum Nachweis des hBD-1-Peptids in Gewebepreparaten aus der Bauchspeicheldrüse wurden Resektate von 6 Patienten analysiert. Grundsätzlich wurden für die Immunfärbung mit verschiedenen Antikörpern sowie den Kontrollen Serienschnitte verwendet. Die Spezifität der Immunfärbung wurde bestätigt durch das Fehlen entsprechender Signale auf den mit Pre-Immunsereum behandelten Gewebeschnitten. Zur weiteren Kontrolle und für Vergleichszwecke wurden parallel zu der hBD-1-Immunfärbung Gewebeschnitte mit kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern gegen HNP-1 bis 3 (DEF3) und gegen ECP (eosinophil cationic protein; EG2) behandelt.

² ANMERKUNG: Immunhistologische Experimente an Nierenpräparaten mit fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern (anti-Maus-IgG-Cy2/Cy3) resultierten in einem gegenüber dem Hintergrundsignal (Eigenfluoreszenz und Negativkontrolle) tendenziell erhöhtem Signal, das diffus über alle epithelialen Strukturen verteilt erschien.

Nach Angaben des Herstellers färbt DEF3 reife Neutrophile. DEF 3 ist spezifisch für HNP-1 bis HNP-3. Es ist nicht untersucht, ob der Antikörper mit HNP-4 reagiert.

Der Antikörper EG2 erkennt aktivierte Eosinophile. Er bindet an die sezernierten Formen der eosinophilen Granulaproteine ECP und EPX (eosinophil protein X/eosinophil derived neurotoxin).

Patientencharakteristika und die Ergebnisse der Immunfärbungen sind in Tabelle IV und den Abbildungen 4.18 ff. dargestellt.

Tabelle IV: Auswertung der hBD-1-Immunfärbung in humanen Pankreas-Gewebeschnitten: Patientencharakteristika und histologische Befunde.

Patient	Sex	Alter	Diagnose	Histologie	hBD-1		HNP-1
1	m	17	Donor	normales Gewebe	Azinus +++	Ductus ++	++
2	m	70	PCa	normales Gewebe	Azinus --	Ductus --	+
3	m	51	cP	entzündetes Gewebe	Azinus --	Ductus +++	+++
4	m	53	cP	entzündetes Gewebe	Azinus ++	Ductus --	++++
5	m	42	cP	normales Gewebe	Azinus +++	Ductus ++	++
6	f	47	cP	entzündetes Gewebe	Azinus +	Ductus --	++++

In allen Experimenten erfolgte die Immunfärbung der Gewebeschnitte mit anti-hBD-1-Serum, anti-HNP-1 bis 3-Serum oder mit Seren von nicht gegen Defensine immunisierten Tieren (Pre-Immuneserum, anti-ECP-Serum). hBD-1-positive Zellen wurden im Epithel von Pankreasgängen (ducti) und Azinuszellen lokalisiert. HNP-1 bis 3 fand sich in infiltrierenden Zellen innerhalb der Lamina propria, des Bindegewebes und der Lobule, aber nicht in epithelialen Zellen. Abkürzungen: m, maskulin; f, feminin; cP, chronische Pankreatitis; PCa, Pankreaskarzinom; **(hBD-1-Immunfärbung:** -, keine immunreaktiven Zellen; +, vereinzelt immunreaktive Zellen; ++, moderate Anzahl von immunreaktiven Zellen; +++, sehr viele immunreaktive Zellen; **HNP-1/3-Immunfärbung:** -, keine PMNs; +, vereinzelt positive Zellen; ++, fokale Infiltration in der Lamina propria; +++, moderate Infiltration überall in der Lamina propria; +++++, schwere Infiltration überall in Lamina propria und Epithelium.

Bei 5 von 6 untersuchten Patienten werden hBD-1-immunreaktive Zellen ausschließlich im exokrinen Teil der Bauchspeicheldrüse gefunden. Eine Probe zeigt keine hBD-1-immunreaktiven Zellen. In allen Gewebeschnitten sind die Langerhansschen Inseln frei von hBD-1. Insgesamt ist das individuelle Färbemuster (Intensität der Immunfärbung und

Verteilung der Lokalisation) zwischen den einzelnen Patienten sehr variabel (Tabelle IV). In den hBD-1-positiven Präparaten zeigt die Immunhistochemie, dass das Peptid in Azinuszellen apikal vom Kern, d.h. zum Lumen gerichtet lokalisiert ist (Abb. 4.18).

Dagegen zeigt sich bei interlobularen Ducti eine diffus verteilte Immunfärbung des gesamten Epithels (Abb. 4.19). In intralobularen (intercalated) Ducti ist bei einigen Proben eine granuläre Färbung der Epithelzellen zu sehen. Desweiteren finden sich bei einigen Patienten vereinzelt hBD-1-positive Zellen in der Lamina propria der Pankreasgänge.

HNP-1 bis 3 ist ausschließlich in Zellen innerhalb der Lamina propria (Pankreaskopf) sowie in infiltrierenden Zellen innerhalb der gesamten Stroma (Bindegewebssepten, Lobulis) lokalisiert.

4.7.3 hBD-1-Peptid im Dickdarm

Wie im Pankreas unterscheidet sich im Kolon das Verteilungsmuster der Immunfärbung interindividuell. Im Kolongewebe von zwei Patienten mit Colitis ulcerosa sind keine immunhistologisch detektierbaren Mengen von hBD-1 zu finden.

Die Immunfärbung des Kolongewebes von einem Organspender zeigt ein schwaches, diffus verteiltes, hBD-1-spezifisches Signal in allen Krypten. Zudem finden sich einzelne hBD-1-positive Zellen innerhalb der Lamina propria (Abb. 4.20 B). HNP-1 bis 3-positiv Zellen sind ausschließlich in Zellen innerhalb der Lamina propria zu finden (Abb. 4.20 A).

Im Kolon einer Patientin mit eosinophiler Enteritis ist hBD-1 in den Becherzellen der Lieberkühnschen Krypten in einem engen Bereich apikal vom Kern lokalisiert (Abb. 4.18 A). Die hBD-1-spezifischen Signale reichen in der Tunica mucosa von der Kryptenspitze bis zum Kryptengrund (Abb. 4.21). In Submukosa und Muskularis ist hBD-1 nicht zu detektieren.

Im Gegensatz zum β -Defensin färbt der Antikörper gegen HNP-1 bis 3 intensiv zytoplasmatische Granula von Zellen, die der Morphologie nach Neutrophilen entsprechen. Infiltrierende Neutrophile werden in luminalen Bereichen und innerhalb der Lamina propria detektiert (Abb. 4.21). Mit dem Antikörper gegen sezernierte Eosinophilenproteine werden vereinzelt Zellen in der Lamina propria detektiert (Abb. 4.21 C).

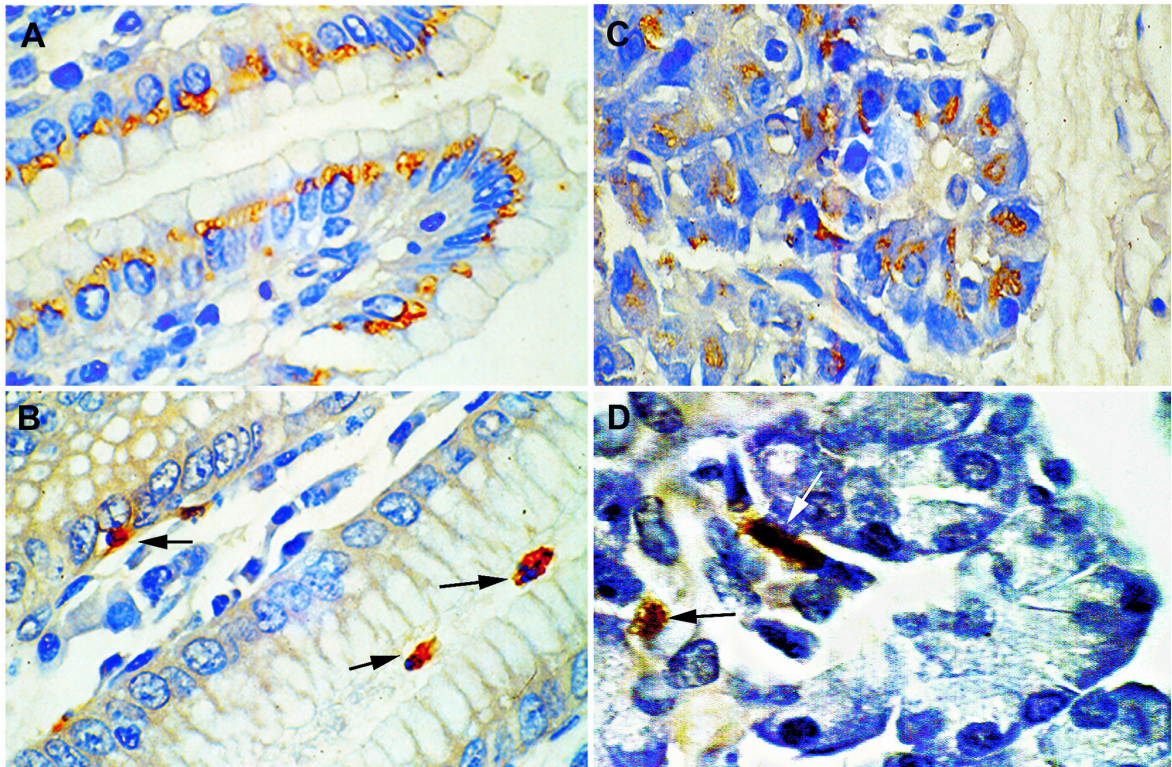


Abb. 4.18: Immunhistochemischer Nachweis von hBD-1 und HNP-1 bis 3 in Dickdarm und Bauchspeicheldrüse. (A+B) Immunfärbung eines Kolongewebes von einer weiblichen Patientin mit Eosinophiler Enteritis. (A) Immunfärbung des Kolons mit anti-hBD-1. Nahezu alle Becherzellen sind immunreaktiv für hBD-1. Das Peptid findet sich rund um den Kern, dort wo Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum lokalisiert sind, nicht aber im supranukleären Zytoplasma. (B) Immunfärbung des Kolons mit anti-HNP-1 bis 3. (C+D) Immunfärbung eines Pankreasgewebes von einem männlichen Patienten mit Pankreastumor. (C) Immunfärbung mit anti-hBD-1. Das Peptid ist in Azinuszellen apikal vom Kern lokalisiert. (D) Immunfärbung mit anti-HNP-1 bis 3. Die Abbildung zeigt zwei HNP-1 bis 3-positive Zellen im exokrinen Pankreas (Pfeile). Die Azinuszellen zeigen keine Immunreaktivität für HNP-1 bis 3. Die Immunreaktionen sind mit DAB entwickelt. Gegenfärbung: Hematoxylin. Vergrößerung: 250 x. Augenscheinlich finden sich bei Pankreas und Kolon sehr ähnliche Färbemuster.

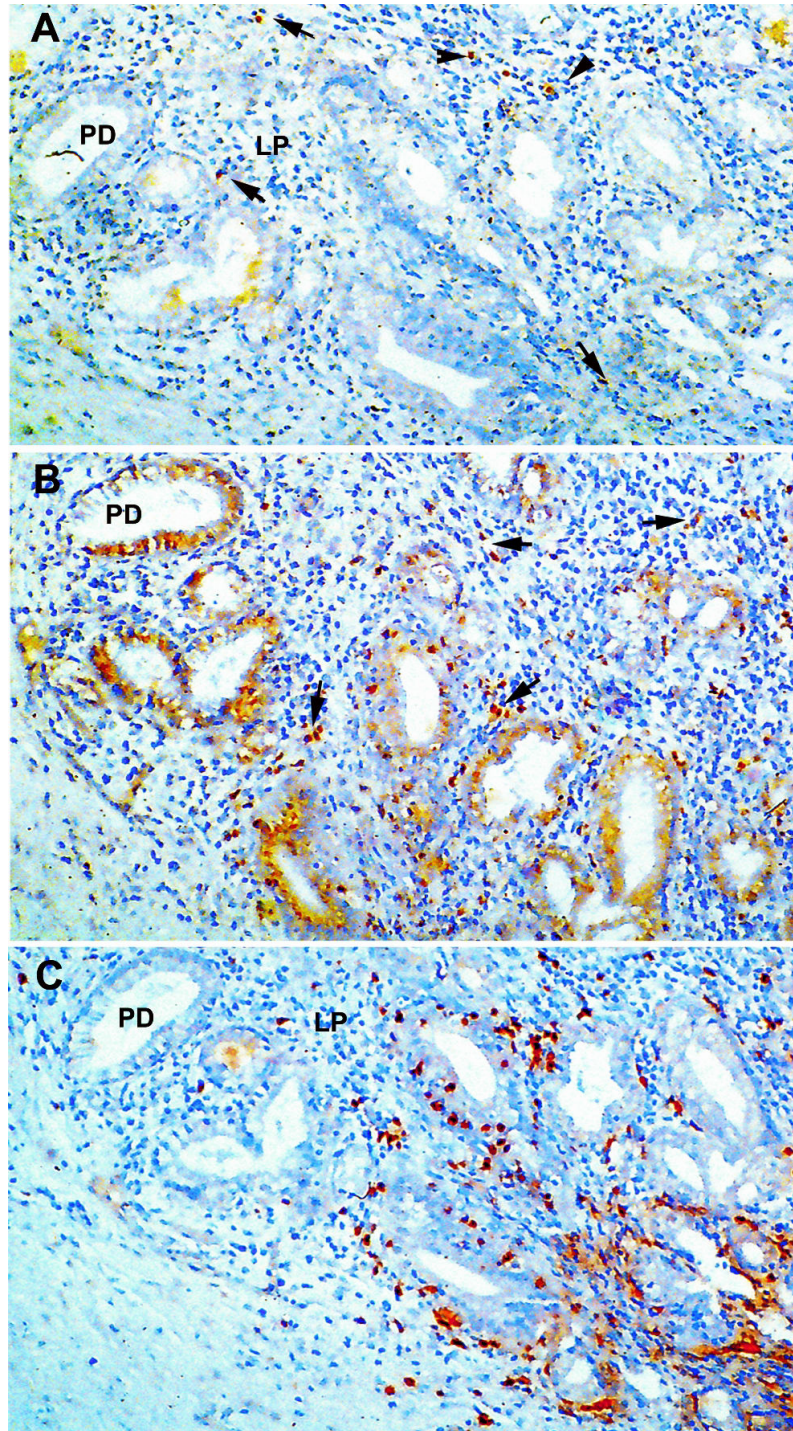


Abb. 4.19: Serielle Gewebeschnitte aus dem Pankreas (Pankreaskopf) von einem männlichen Patienten mit **chronischer Pankreatitis**. Die Immunfärbung stellt (A) anti-ECP, (B) anti-hBD-1 oder (C) anti-HNP-1 bis 3 dar. Gegenfärbung: Hematoxylin. (A) Innerhalb der Lamina propria finden sich vereinzelt immunreaktive Zellen, die aktivierte Eosinophile repräsentieren. (B) Die Immunfärbung mit anti-hBD-1 führt zu einer intensiven Färbung des gesamten Epithels der Pankreasgänge. Im Lumen der Gänge findet sich kein hBD-1. Dagegen finden sich in diesem Präparat auch einige hBD-1-positive Zellen innerhalb der Lamina propria, aber die Anzahl von HNP-1 bis 3-positiven Zellen (C) ist bedeutend größer. Die Abbildung zeigt deutlich, dass das Muster der Immunreaktivität in allen drei Präparaten unterschiedlich ist. PD, Pankreas Ductus; LP, Lamina propria. Immunreaktive Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

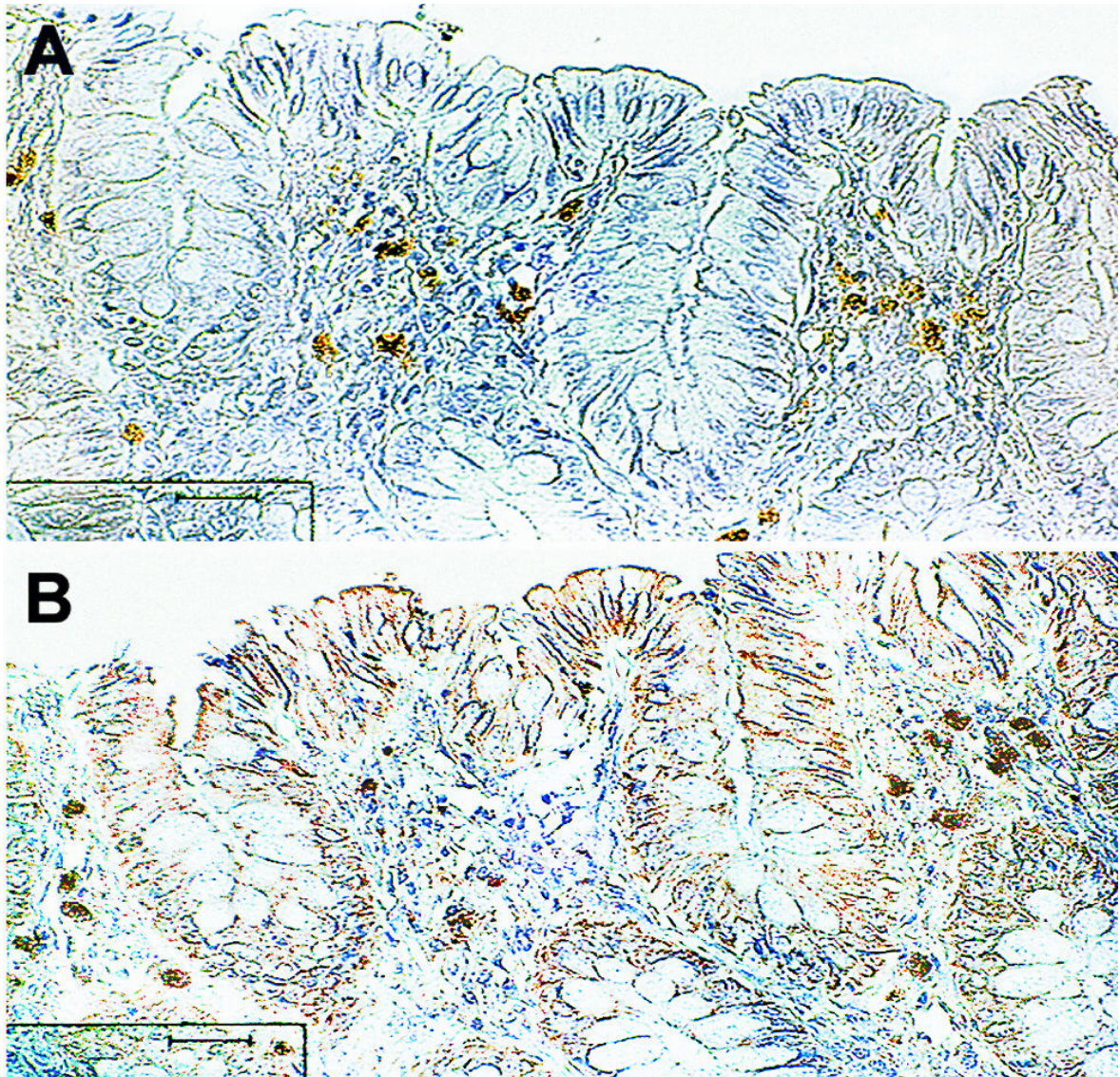


Abb. 4.20. Serielle Gewebeschnitte des humanen Kolons eines Organspenders. (A) Immunfärbung mit anti-HNP-1 bis 3. (B) Immunfärbung mit anti-hBD-1. Der Balken entspricht 100 µm.

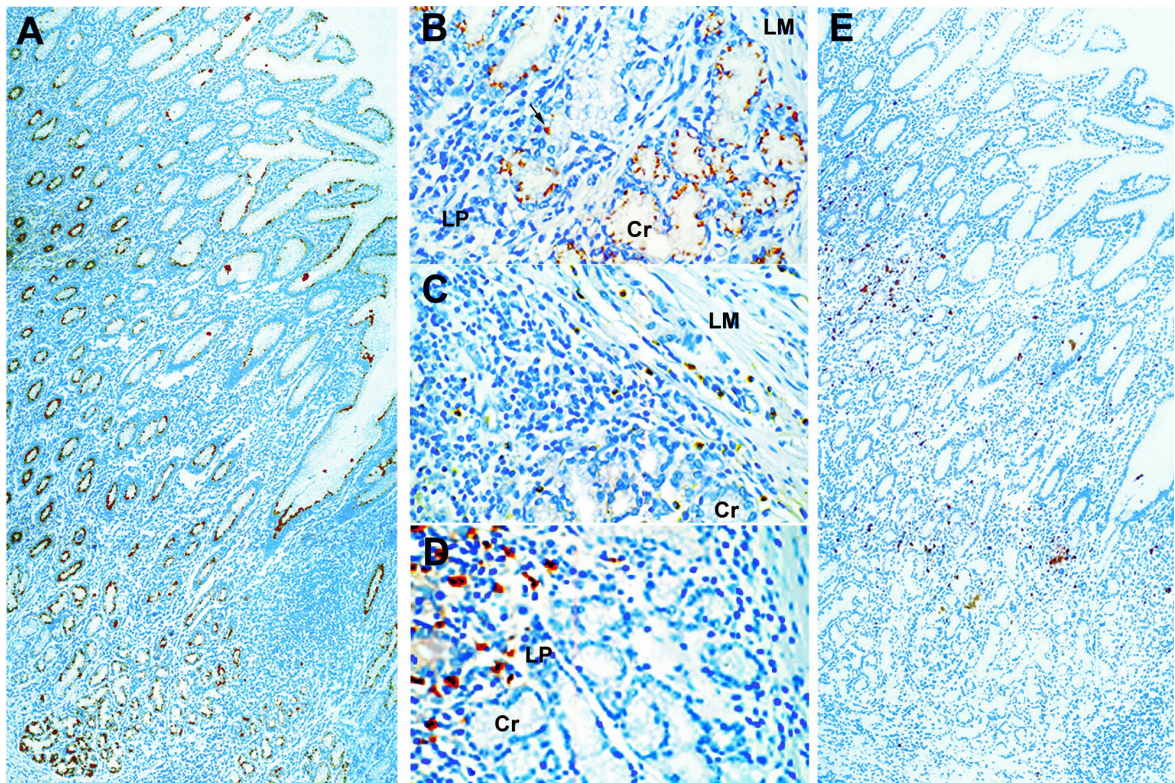


Abb. 4.21. Fotografie eines longitudinalen Schnittes durch die Wand des humanen Kolons einer weiblichen Patientin mit eosinophiler Enteritis. (A + B) Kolonkrypten sind mit anti-hBD-1 gefärbt. (D + E) Kolon mit anti-HNP-1 bis 3 gefärbt. (C) Immunfärbung mit anti-ECP. Vergrößerung A + E = 25 x. Vergrößerung B, C, D = 100 x. LP, Lamina propria; LM, Lamina muscularis mucosae; Cr, Krypten.

4.8 Expression des hBD-1-Gens im Pankreasgewebe verschiedener Patienten

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass die hBD-1-Translation interindividuell sehr variabel ist. Eine exakte quantifizierende Auswertung des hBD-1-Peptides in den immunhistologischen Präparaten ist aber, nicht zuletzt wegen der Inhomogenität der individuellen Gewebeschnitte, schwerlich durchzuführen. Um dennoch mögliche Beziehungen zwischen hBD-1 und anderen patientenbezogenen Parametern wie der Diagnose oder dem Krankheitsstatus herstellen zu können, wurde die hBD-1-Genexpression im Pankreasgewebe von verschiedenen Patienten bestimmt.

Zur Quantifizierung der hBD-1-mRNA wurde eine Northern-Blot-Analyse mit Pankreasgewebe von 19 Patienten (5 x Pankreaskarzinom (PCa), 8 x chronische Pankreatitis (cP), 6 x histologisch unauffälliges Gewebe aus tumorfernen Abschnitten oder von Organspendern (NP)) durchgeführt. Die hBD-1-Expression wurde gegen die Expression der ubiquitären GAPDH normalisiert und mit Routine-Laborparametern korreliert.

Bei 17 von 19 Patienten (89 %) konnten detektierbare Mengen von hBD-1-mRNA im Pankreasgewebe nachgewiesen werden (Abb. 4.22). In Übereinstimmung mit den aus der Immunhistologie erhaltenen Daten, variieren die relativen hBD-1-mRNA-Mengen zwischen den Patienten sehr stark (Bereich: 0 bis 7,6; Variationskoeffizient: 108 %) (Abb. 4.23).

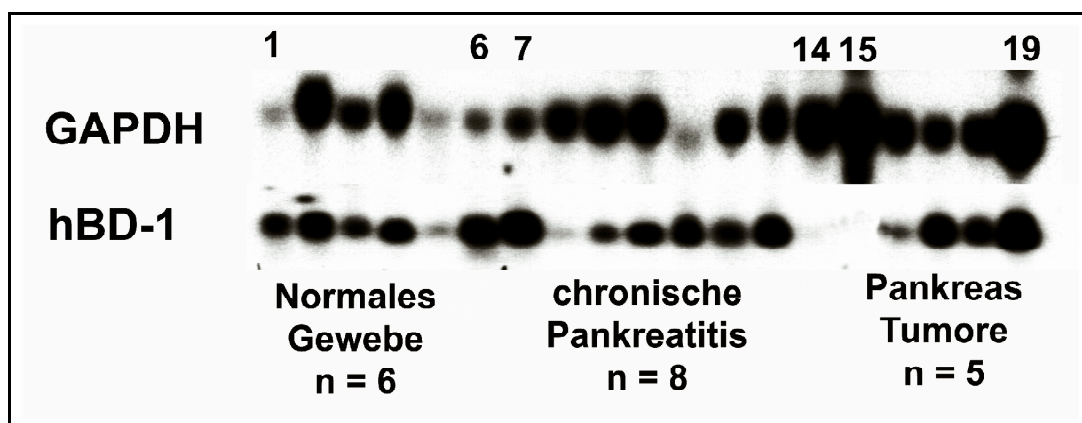


Abb. 4.22. Northern-Blot-Analyse der individuellen hBD-1-Genexpression in pankreatischem Gewebe. Jeweils 20 μ g RNA von 19 humanen Geweben sind auf einen PVDF-Filter transferiert und mit einer hBD-1-spezifischen Sonde entsprechend der Peptidposition von Met₁ bis Lys₆₈ hybridisiert. Die Expression des Enzyms Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle und zur Normierung der hBD-1-Expression ist in den oberen Teilen der Blots zu sehen.

Die hBD-1-Expression korreliert mit keinem der hier untersuchten Parameter (alle $p > 0,05$, Mann-Whitney U-Test). Sie ist weder altersabhängig (Bereich: 32 - 75 Jahre, Median: 46 Jahre) noch geschlechtsspezifisch (weiblich : männlich = 7 : 12).

Auch die Beziehungen zu entzündungs- oder pankreasspezifischen Laborparametern wie Leukozytenzahl (Bereich: 4,4 - 20,1 Tsd./ μ l, Median: 6,6 Tsd./ μ l) oder Serum-Amylase (Bereich: 45 - 945 U/l, Median: 119 U/l) sind statistisch nicht signifikant.

Die höchste hBD-1-mRNA-Expression ist in histologisch unauffälligem Gewebe zu finden, aber im Durchschnitt ist sowohl die absolute als auch die relative hBD-1-mRNA-Menge in allen Patientengruppen statistisch gleich (hBD-1-mRNA/GAPDH-mRNA; Median: Pca = 1,40; cP = 1,25; NP = 1,35; $p > 0,05$) (Abb. 4.23).

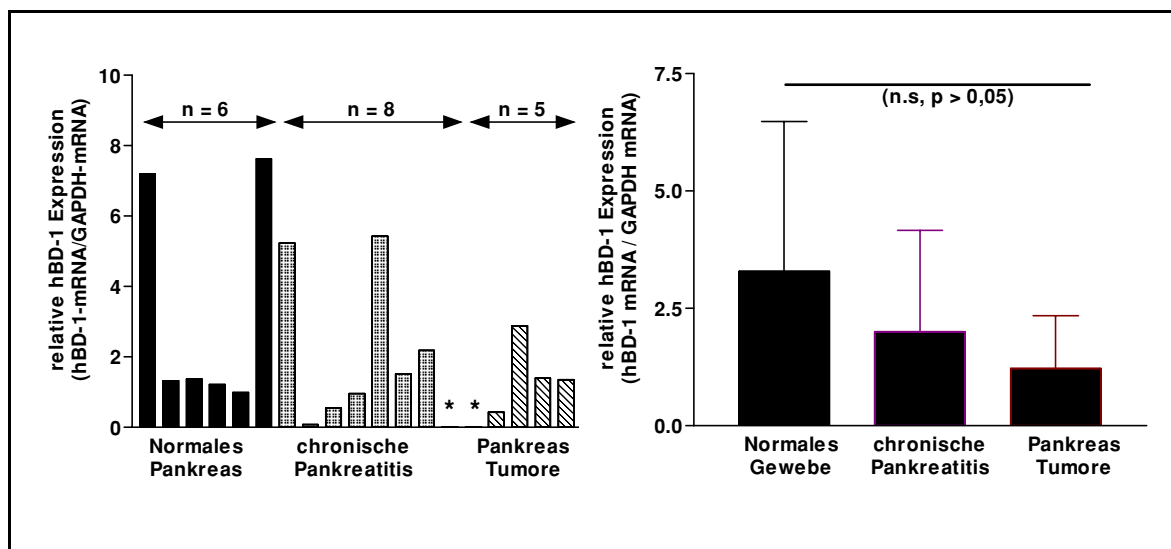


Abb. 4.23: hBD-1-Expression im Pankreasgewebe verschiedener Patienten. (Links) Die Balken repräsentieren die relative hBD-1-Genexpression in der Bauchspeicheldrüse von 19 Patienten. Die Signale des Northern-Blots sind mittels computergestützter Bildanalyse quantifiziert [Wicht *et al.*, 1999] und auf die Expression von GAPDH normalisiert. Die Daten sind als Quotienten des digitalisierten Signals für hBD-1 durch das für GAPDH dargestellt. * = keine detektierbare hBD-1-mRNA. (Rechts) Durchschnittliche relative hBD-1-mRNA-Menge in den verschiedenen Patientengruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte (Balken) plus die Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant.

5.0 Diskussion

5.1 Allgemeines

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide aus humanem Blut und Urin isoliert und charakterisiert, die aufgrund von Sequenzhomologien den Defensinen zugerechnet werden. Defensine sind eine Familie phylogenetisch alter Peptide, die in verschiedensten Mitgliedern des Tier- und Pflanzenreiches gefunden werden. Diese zur Erhaltung der immunologischen Integrität höherer Organismen bedeutsamen Peptide unterlagen im Laufe der Evolution einer starken Diversifikation, die zur Ausbildung von Subfamilien führte (Abb. 5.1).

Die Mitglieder dieser Peptidfamilie haben die lebenswichtige Funktion das Wachstum von Mikroorganismen zu inhibieren, und somit gehören sie zum Repertoire, das ein Wirtsorganismus zur Abwehr von potentiell pathogenen Eindringlingen unabdingbar benötigt, um im biologischen Selektionskampf zu überleben [Übersichtsartikel siehe Lehrer *et al.*, 1992; Ganz *et al.*, 1995; Ganz & Lehrer 1998].

Die vielfach beschriebenen bakteriziden und antiviralen Effekte von Defensinen sowie die Möglichkeit ihrer Induzierung nach einer mikrobiellen Infektion mukosaler Epithelien tragen nach allgemeiner Ansicht zum Schutz mukosaler Gewebe bei [Jones & Bevins, 1992; Stolzenberg *et al.*, 1997; Darmoul *et al.*, 1997]. Dabei stehen einige Vertreter dieser Peptidfamilie an vorderster Abwehrlinie, um das Eindringen von potentiellen Schädlingen zu verhindern. Andere solcher Peptide wirken in tieferen Gewebsschichten oder in Körperflüssigkeiten und unterstützen die systemische Abwehr.

Die systematische Analyse von humanen Körperflüssigkeiten mittels massenspektrometrischer Methoden mit nachfolgender Identifizierung der korrespondierenden Peptide führte zu einer detaillierten Übersicht über natürlich vorkommende Peptide. hBD-1, das erste bekannte humane β -Defensin, wurde durch diese Methode in Hämofiltrat als ein 36 Aminosäuren (AS) enthaltendes Peptid identifiziert [Bensch *et al.*, 1995]. Es wird hier als hBD-1-(D₃₃-K₆₈) bezeichnet. hBD-1 gehört aufgrund der Sequenzhomologie zur Subfamilie der β -Defensine. Es ist deshalb anzunehmen, dass dieses Peptid die grundlegenden Charakteristika der Defensine teilt.

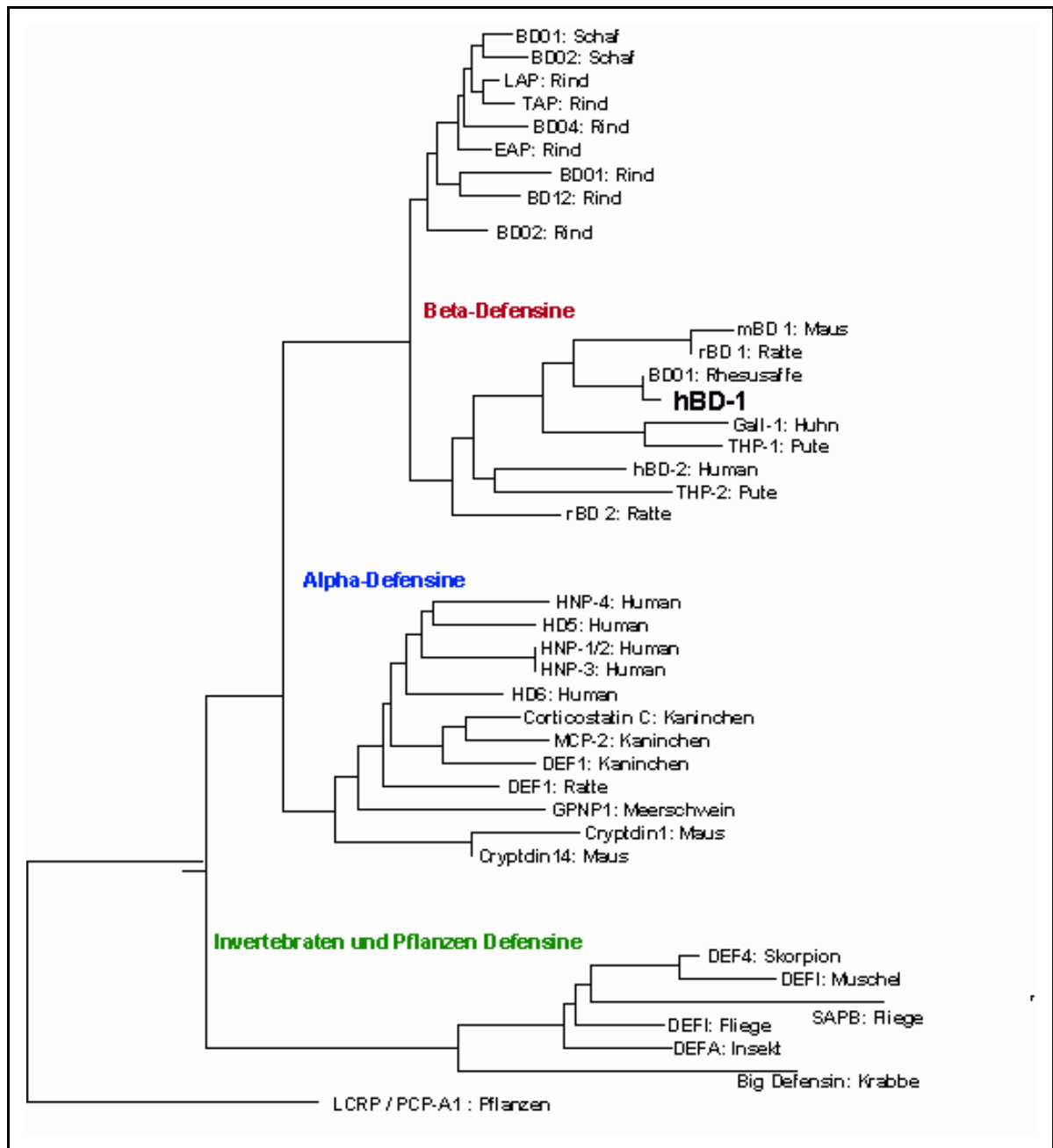


Abb. 5.1: Schematisches Dendrogramm phylogenetischer Beziehung zwischen Defensinfamilien. Dargestellt ist die aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen erschlossene, relative phylogenetische Verwandtschaft verschiedener Defensine. Der phylogenetische Baum wurde computergestützt mit der frei erhältlichen Software CLUSTAL X (1.5b) Multiple Sequence Alignment Program berechnet.

5.2 Diversifikation von Defensinen durch N-terminale Variation

In Rahmen dieser Arbeit sollten systematisch die molekularen Varianten von hBD-1 analysiert werden, die sich im Blut und Urin nachweisen lassen. Tatsächlich konnten zahlreiche Varianten des Peptids dargestellt werden, die durch Abspaltung von N-terminalen Aminosäuren aus dem 68 AS langen hBD-1-Vorläufermolekül generiert werden.

Der Precursor von hBD-1 hat eine typische hydrophobe N-terminale Signalsequenz. Die hypothetische Spaltstelle für eine Signalpeptidase befindet sich zwischen den Aminosäuren G21-G22 [Von Heijne, 1986]. Diese Spaltung würde zu einem 47 AS langen Propeptid führen. Im Gegensatz zu den Propeptiden der α -Defensine HNP-1 und HNP-3 konnte ein solches Peptid von uns weder in Hämofiltrat noch in Urin detektiert werden. Dagegen ist die längste identifizierte Variante das 44 AS lange hBD-1-(L₂₅-K₆₈). Es bleibt unklar, ob hBD-1-(L₂₅-K₆₈) das tatsächliche Propeptid darstellt oder ob ein zweiter Prozessierungsschritt aus dem angenommenen Propeptid hBD-1-(G₂₂-K₆₈) zu einem schnellen Abbau in das stabilere hBD-1-(L₂₅-K₆₈) führt. Dass das 44 AS Peptid ein wichtiges Produkt bei der Prozessierung von hBD-1 ist, wird durch den Befund unterstützt, dass diese Variante mehr als 80 % der gesamten nachweisbaren hBD-1-Menge im Urin ausmacht. Zudem wird es im Hämofiltrat detektiert, auch wenn die vorherrschenden hBD-1-Varianten hier die N-terminal fast komplett gekürzten hBD-1-(D₃₃-K₆₈) und hBD-1-(N₃₆-K₆₈) sind.

Die Entfernung von N-terminal lokalisierten AS von hBD-1 und α -Defensinen muss nicht notwendigerweise einen Satz spezifischer Enzyme erfordern, da die Varianten hinreichend durch die hohe Stabilität des C-terminalen Molekülteils und das Vorhandensein unspezifischer Proteasen erklärt werden können. Nach (1) den Schnittstellen, die sich aus den identifizierten hBD-1 Varianten ableiten und (2) den Ergebnissen aus den *In-vitro*-Experimenten ist die Verkürzung von hBD-1 durch die Aktivität einer Chymotrypsin-ähnlichen Protease zu erklären. Die *In-vitro*-Spezifität von Chymotrypsin hydrolysiert das Peptid hBD-1-(L₂₅-K₆₈) C-terminal nach den Aminosäuren Y, S, H und L. Dies ist ausreichend um alle *in vivo* gefundenen Varianten zu erklären. Die *in vitro* fehlende Bildung von hBD-1-(T₂₆-K₆₈) aus hBD-1-(L₂₅-K₆₈) ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Endopeptidase Chymotrypsin nicht in der Lage ist, die Entfernung eines einzelnen

N-terminalen Restes zu katalysieren. Die Beobachtung von Reaktionsprodukten, freigesetzt durch Hydrolyse C-terminal von Aminosäureresten, die für dieses Enzym nicht üblich sind (Serin, Histidin), weist darauf hin, dass die typischen Chymotrypsin-spezifischen Bindungen wie Y35 - D36 nur langsam hydrolysiert werden.

Der C-terminale Anteil von hBD-1, N36 bis K68 mit den drei Disulfidbrücken ist außergewöhnlich stabil gegenüber Chymotrypsin. Spaltprodukte aus diesem Teil des Moleküls konnten weder *in vitro* noch *in vivo* entdeckt werden. Diese Stabilität gegen Proteasen wird möglicherweise durch die Geometrie der Peptidbindungen determiniert, nämlich durch sterische Behinderung innerhalb des C-terminalen Kerns. Eine ähnliche Resistenz gegen Proteasen wurde auch für das α -Defensin HNP-2 und für viele andere Peptide mit mehreren Disulfidbrücken beschrieben, z.B. die Peptide der Guanylinfamilie [Klodt *et al.*, 1997] oder auch die Trefoil-Peptide [Sands & Podolsky, 1996]. Das erscheint plausibel, wenn man bedenkt, dass all diese Peptide in einer proteasereichen Umgebung agieren. Daraus lässt sich schließen, dass der C-terminale Kern von hBD-1 speziell deshalb so aufgebaut ist, um in Mikrokompartmenten innerhalb der Lunge, der Niere oder des Darmes länger andauernd und effektiv seine Funktion zu erfüllen.

Es ist auszuschließen, dass die Verkürzung von hBD-1 ein präparatives Artefakt ist, da Proteasen, die die Hämofilter passieren könnten, durch unsere präparativen Verfahren effektiv inaktiviert wurden. So gehen wir davon aus, dass alle Molekülvarianten im Hämofiltrat dem Zustand *in vivo* entsprechen, der die Zusammensetzung aller Plasmakonzentrationen einer Summe von Patienten widerspiegelt. Da das Hämofiltrat von Patienten mit chronischem Nierenversagen stammt, könnte allerdings das Peptidmuster im Vergleich zu gesunden Menschen krankheitsbedingt verändert sein. Das Nierenversagen im Endstadium könnte z.B. eine limitierte hBD-1-Synthese in der Niere zur Folge haben. Das Muster von hBD-1-Varianten in der Zirkulation von gesunden Probanden wäre daher in weiteren Studien zu untersuchen. Mögliche interindividuelle Unterschiede im Muster der vorhandenen hBD-1-Varianten ergeben sich nach den Befunden von Valore und Mitarbeitern (1998), die in entsprechenden Untersuchungen ähnliche, aber nicht identische Peptidmuster im Blut, Urin und Vaginallavage verschiedener Individuen fanden (Abb. 5.2).

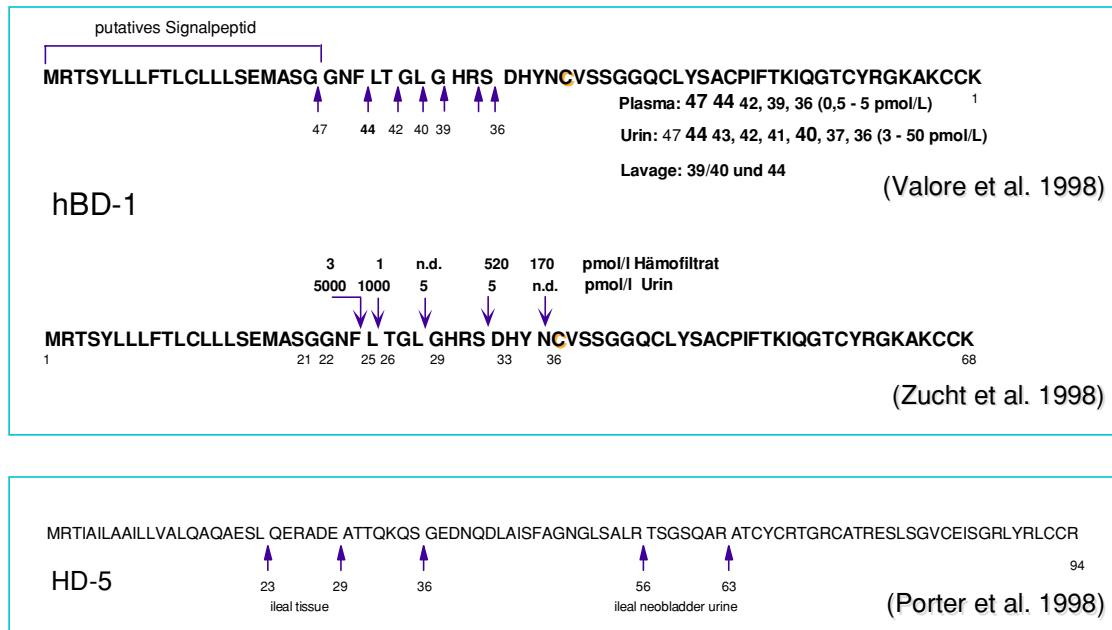


Abb. 5.2: Muster von molekularen Defensinvarianten in Körperflüssigkeiten. Oben: hBD-1-Varianten in Plasma, Urin und Vaginallavage nach Valore *et al.* (1998). Die jeweiligen Hauptvarianten sind fettgedruckt. **Mitte:** Im Rahmen dieser Arbeit gefundene hBD-1-Varianten im Hämofiltrat und im Urin. (n.d. = nicht detektierbar). **Unten:** Molekulare Varianten des α -Defensins HD 5. Im Ileumgewebe dominieren die langen HD-5-Varianten, im Urin aus einer Ileum-Blase fanden sich vorrangig kürzere Varianten [Porter *et al.*, 1998].

Proteolytische Prozessierung wird gewöhnlich bei Proteinen beobachtet, die verschiedene funktionelle Domänen enthalten, die während eines Reifungsprozesses freigesetzt werden. Dabei kann die ursprüngliche Funktion inaktiviert oder eine neue verborgene Funktion generiert werden. Mögliche Funktionen solcher Domänen sind die Kooperation während der Proteinfaltung, die Teilnahme bei Transportvorgängen (Translokation, Sekretion) und schließlich die Entwicklung der Bioaktivität. Derartige Reifungsprozesse wurden für einige antimikrobielle Peptide bzw. Proteine beschrieben. Bei CAP37 sind z.B. zwei nichthomologe Domänen verantwortlich für einerseits die antimikrobielle und Endotoxin-bindende Aktivität und andererseits für ein chemotaktisches Potential [Pereira *et al.*, 1993]. Bei humanen α -Defensinen aus Neutrophilen entstehen erst durch die komplette Entfernung des N-terminalen Propeptids bioaktive antimikrobielle Peptide [Harwig *et al.*, 1992; Valore *et al.*, 1996].

Die N-terminale Verkürzung von hBD-1 erscheint ähnlich der Prozessierung von HNP. Die mikrobiellen Hemmteste zeigen, dass die kürzeren Varianten von hBD-1 keine signifikant höhere antimikrobielle Potenz haben, was darauf hindeutet, dass die Entfernung von N-terminalen Resten keinen relevanten Reifungsprozess im eigentlichen Sinne darstellt.

Die Propeptidsegmente der humanen α -Defensine sind sehr viel azider und länger als die von β -Defensinen. Ihr aktivitätsmaskierender Effekt könnte auf der Neutralisation der für die antimikrobielle Aktivität wichtigen polykationischen Reste sowie auf ihrer Molekülgröße beruhen [Valore *et al.*, 1996].

Obwohl die Aktivitätsprofile der β -Defensin-Varianten nicht auf eine direkte Korrelation zur Länge des N-Terminus hinweisen, zeigen unsere Ergebnisse (siehe auch Abschnitt 4.2), dass die Variation des N-terminalen Bereiches die Bioaktivität von hBD-1 in Abhängigkeit von den Zielorganismen sowie den Umgebungsparametern wie z.B. Salzkonzentration und pH moduliert [Zucht *et al.*, 1998; Valore *et al.*, 1998]. Interessanterweise findet sich eine Modulation des antibiotischen Potentials von Defensinen durch molekulare Variationen und Umgebungsbedingungen auch bei anderen Mitgliedern dieser Peptidfamilie [Miyakawa *et al.*, 1990; Ouellette *et al.*, 1994, Porter *et al.*, 1997; Bals *et al.*, 1998]. Diese Anpassungsfähigkeit kann der Schlüssel zum evolutionären Erfolg der endogenen Peptidantibiotika sein.

Die limitierte Anzahl von bisher nur acht humanen Defensinen steht im Gegensatz zu der hohen Anzahl von z.B. mehr als 20 bekannten murinen und 16 bovinen Defensinsequenzen, die durch eine entsprechende Anzahl von Genen codiert werden. Erst die Aufschlüsselung des humanen Genoms und verschiedener Säugerspezies wird zeigen, ob diese Diversifikation im Genom verankert ist. Molekulare Variation und physiko-chemische Modulation der Bioaktivität von humanen Defensinen würden aber hier zur Diversifikation dieser Peptide beitragen. Die Effizienz des humanen antimikrobiellen Verteidigungsarsenals wird durch die vielfältige Prozessierung sicher gesteigert. Das Essentielle dieser Multivarianz ist nämlich die damit verbundene Funktionsbreite, die aus dem veränderten Potential des einzelnen biogenen hBD-1 hervorgeht.

Durch die posttranslationale Generierung von molekularen Defensin-Varianten aus jeweils einem einzigen Vorläufermolekül kann somit eine große Anzahl funktioneller Defensine mit individuellen Eigenschaften freigesetzt werden. Auf diese Weise stände dem Wirt eine Palette antimikrobieller Substanzen zur Verfügung, die der Anforderung genüge, Mikroorganismen verschiedenster Art abwehren zu können.

5.3 Ursprung des hBD-1-Peptids

Die Zuordnung der hBD-1-Biosynthese zu spezifischen Zellen ist ein Schlüssel zum Verständnis der funktionellen Charakteristika dieses Peptids. Trotz der weitverbreiteten Expression von hBD-1-mRNA in nahezu allen epithelialen Geweben und sekretorischen Drüsen und der Entdeckung des Peptids in vielen Körperflüssigkeiten wie Plasma [Bensch *et al.*, 1995], Urin [Zucht *et al.*, 1998], Vaginallavage [Valore *et al.*, 1998], Atemwegsekrete [Bals *et al.*, 1998], Lungenspülflüssigkeiten [Singh *et al.*, 1998] und Tränenflüssigkeit [Haynes *et al.*, 1998] wurde eine zellspezifische *In-vivo*-Synthese zum funktionellen Peptid bislang nicht demonstriert.

Die hBD-1-Bildung in den Organen, die eine korrespondierende mRNA besitzen, ist bislang nicht eindeutig gezeigt. Umfangreiche Analysen belegen, dass hBD-1 in epithelialen und mukosalen Zellen konstitutiv, wenn auch meist auf niedrigem Niveau, exprimiert wird. Die niedrigen Expressionsraten erschweren die Feinlokalisierung von hBD-1 mit molekularbiologischen Methoden. Ungleich komplexer gestaltet sich die Bestimmung des korrespondierenden Peptides im Gewebe und den zugehörigen Körperflüssigkeiten. Die ermittelten hBD-1-Konzentrationen sind generell sehr klein (pM-nM) und unterliegen offensichtlich inter- und intraindividuellen Schwankungen. Diese belegen unsere Untersuchungen an intestinalen Geweben diverser Patienten.

Ein wichtiger Wirkort für Defensine dürften Lunge und Atemwege sein. So wird eine Beteiligung dieser Peptide, insbesondere der β -Defensine, in der Pathogenese der Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) diskutiert [McCray *et al.*, 1997; Goldman *et al.*, 1997], weshalb dieser Bereich von verschiedenen Gruppen intensiv bearbeitet wurde. Schnapp & Harris (1998) fanden zwar α -Defensine in Broncho-Alveolar-Lavage-Flüssigkeit (BAL) von sieben Patienten mit Verdacht auf Lungentumor, aber kein hBD-1. Keiner der Patienten hatte Anzeichen einer Infektion oder Entzündung. Dahingegen führten die Arbeiten von Singh *et al.* (1998) zu einem gegensätzlichen Ergebnis. Bei der Untersuchung von gesunden Probanden, CF-Patienten und Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen konnten sie in der BAL beide bekannten humanen β -Defensine nachweisen. Dabei wurde hBD-2 nur in BAL von Patienten gefunden, wohingegen hBD-1 auch bei gesunden Probanden detektierbar war.

Diese Resultate untermauern den von uns gezeigten, fehlenden Zusammenhang zwischen Diagnose und hBD-1 (Abschnitt 4.8). Zudem deuten diese Ergebnisse an, dass die Biosynthese von hBD-1 zum reifen Peptid trotz konstitutiver Transkription vermutlich von bislang nicht entdeckten Mediatoren gesteuert wird. Über die Biosynthese von HNP und Lysozym ist bekannt, dass Faktoren wie der Zeitpunkt der Biosynthese oder der Reifezustand der synthetisierenden Zellen Translation und Translokation dieser Peptide beeinflussen [Arnljots *et al.*, 1998]. Ein weiterer Hinweis für eine Regulation der hBD-1-Synthese auf Translationsebene könnten auch die Resultate der Western-Blot-Analyse sein (Abb. 4.17). Diese zeigt, dass hBD-1-mRNA exprimierende Zellen keine detektierbaren Mengen Peptid enthalten können.

Die von Valore *et al.* (1998) durchgeführten peptidchemischen Analysen von Blut, Urin und Vaginallavage lassen einen Zusammenhang zwischen der hBD-1-Konzentration und dem Verlauf des weiblichen Zyklus erkennen. Diese Befunde könnten ein Indiz für eine hormonelle Regulation der hBD-1-Konzentration darstellen. Neuerdings wird sogar in ersten Ansätzen ein Potential für Defensine als Empfängnisverhütungsmittel postuliert [Sawicki & Mystkowska, 1998].

Das urinale hBD-1 kann *a priori* (1) durch renale Filtration und (2) durch tubuläre Sekretion in den Urin gelangen. Bei (1) würde man annehmen, dass hBD-1 im Plasma von gesunden Erwachsenen eine längere Molekülform wäre, als die gefundenen Varianten aus dem Hämofiltrat. Die Expression von hBD-1-mRNA durch U 937- und THP-1-Zellen indizieren, dass hBD-1 aus Monozyten stammen könnte. Die Stimulation von Monozyten während der extrakorporalen Filtration könnte die Homöostase von hBD-1-Peptiden beeinflussen. Andererseits konnten wir bei einer immunzytochemischen Analyse weder in Vollblut-Ausstrichpräparaten noch in Leukozytenpräparationen hBD-1-enthaltende Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Es ist anzunehmen, dass das meiste des urinalen hBD-1 direkt in der Niere synthetisiert und in das Lumen der Tubuli sezerniert wird. Hier ist die spezifische hBD-1-mRNA stark exprimiert, wie die *In-situ*-Hybridisierung der Niere zeigt. Der Befund wird gestützt, da die aus distalen Tubuluszellen stammende Zelllinie IHKE eine starke Expression von hBD-1-mRNA zeigt. Urinales hBD-1 könnte zudem aus anderen Epithelien

des Urogenitaltraktes (Ureter, Blase oder Vagina) stammen, wo die Transkripte von hBD-1 ebenfalls detektiert wurden.

Wenn der Urogenitaltrakt einen Hauptsyntheseort von hBD-1 darstellt, wie aus dem Expressionsmuster von hBD-1-mRNA hervorgeht, stellt sich die Frage, wo sich der zelluläre Syntheseort des spezifischen Peptids befindet. In den von uns durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen der Niere konnten die hBD-1-enthaltenden Zellen nicht detektiert werden. Dieses negative Resultat wird auch in Arbeiten von Valore *et al.* (1998) berichtet. Diese Arbeitsgruppe konnte keine hBD-1-immunreaktiven Zellen in der Niere darstellen. Allerdings fanden sie, im Gegensatz zu uns, hBD-1-spezifische Produkte im Lumen von Henle'schen Schleifen. Aus ihren Resultaten folgerten sie, dass hBD-1 nach der Synthese vermutlich ohne intrazelluläre Speicherung in das Lumen freigesetzt wird. Dies wurde auch für das bovine β -Defensin TAP, das von Epithelzellen ohne sichtbare zytoplasmatische Granula sezerniert wird, beschrieben [Ganz & Lehrer, 1995]. Innerhalb der β -Defensine gibt es deutliche Unterschiede zwischen hBD-1 und TAP sowie auch zu α -Defensinen, die unzweifelhaft in intrazellulären Granula gespeichert werden, wie HNP-1 bis 3 oder HD 5 [Lui & Ganz, 1995; Porter *et al.*, 1997]. Betrachtet man z.B. die für die Translokation von Peptiden bedeutsamen Signalfelder von hBD-1 und anderen Defensinen, eröffnet sich die Möglichkeit einer Gruppierung dieser Peptide auf der Grundlage bestimmter physiko-chemischer Eigenschaften, die für den Transportweg und die Ziele von Peptiden von Bedeutung sind (Abb. 5.3).

Die Resultate der Immunfärbung in Pankreas und Kolon sprechen gegen eine Speicherung von hBD-1 in zytoplasmatischen Granula in den hBD-1-synthetisierenden Zellen. In beiden Geweben fanden wir hBD-1 im Bereich des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) und des Golgi-Apparates von sekretorischen Zellen. Dagegen waren das Zytoplasma (Theca) und die Mukustropfen der Becherzellen frei von hBD-1.

Im rER werden Proteine gebildet, die für Membranen, Lysosomen und den Export aus der Zelle bestimmt sind. Vom rER können Proteine in den Golgi-Apparat gelangen, wo sie nach posttranslationaler Modifikation durch Zellsorting schließlich zu verschiedenen Zellorganellen oder in den Extrazellulärbereich transportiert werden. Die Notwendigkeit, für eine erfolgreiche Immunhistologie membranpermeabilisierende Agenzien wie Triton X-100

und Saponin einzusetzen, unterstreicht die Vermutung, dass hBD-1 in subzellulären Organellen lokalisiert ist³.

		*	:	*	:	:	.
1	hBD-2	MRVLY	-	LLFS	FLFI	FLMPL	PG--VFGG
2	BD01_Affe	MRTSY	LLL	FTL	CLLL	SEMAS	SGDNFLTGI
3	BD01_Maus	MKTHY	FLL	VMIC	FLFS	SQMEP	GVGILTSTI
4	BD01_Ratte	MKTHY	FLL	VML	FFLFS	SQME	LGAGILTSTI
5	hBD-1	MRTSY	LLL	FTL	CLLL	SEMAS	SGGNFLTGI
6	TAP_Rind	MRLHH	LLL	LALL	FLVL	SAWSG	FTQGVGNI
7	LAP_Rind	MRLHH	LLL	LALL	FLVL	SAGSG	FTQGVVNI
8	BD01_Schaf	MRLHH	LLL	VLFF	VVLS	SAGSG	FTQGVVNI
9	BD04_Rind	MRLHH	LLL	AVL	FLVL	SAGSG	FTQVRVNI
10	HNP-1/2	MRTL	AIL	AAI	LLV	ALQAQ	AEPLQARADI
11	HD-5	MRTI	AIL	AAI	LLV	ALQAQ	AEPLQERADI
12	DEF1_Kaninchen	MRTL	LIL	AAI	LLA	ALQAQ	AEPLFSVNVDI

Abb. 5.3: Vergleich putativer Signalsequenzen verschiedener Defensine. Die Abbildung illustriert, dass es verschiedene Gruppen von Defensin-Signalpeptiden gibt. Die Signalsequenzen der β -Defensine hBD-1 und TAP unterscheiden sich deutlich. Aminosäuren mit ähnlichen physiko-chemischen Eigenschaften sind mit gleicher Farbe unterlegt.

Inwieweit eine aktive Sekretion (konstitutiv oder reguliert) in das Lumen oder eine Freisetzung von hBD-1 in den Interzellularraum erfolgt, kann auf der Grundlage der vorliegenden Daten nicht eindeutig beantwortet werden. Die vorhandenen Daten sprechen jedoch dafür, dass hBD-1 vermutlich primär ein intra- und interzelluläres Peptid ist, was die Hypothese von hBD-1 als gewebe-orientierter, physiologischer Schutzsubstanz unterstützt.

³ ANMERKUNG: Interessanterweise führt eine Analyse der hBD-1-AS-Sequenz mit der Software PSORT-Prediction of Protein Localization Sites V 6.4 (WWW) [<http://psort.nibb.ac.jp:8800/cgi-bin/okumura.pl>] zu dem Ergebnis, dass hBD-1 mögliche Signale für den Weitertransport in die Mitochondrien aufweist (Pos. 63: YRGKKA; apolarer Bereich für intramitochondriale Sortierung). Die Membranen von Mitochondrien enthalten, genau wie die von Gram-negativen Bakterien und Chloroplasten, Proteine, die als Porine bezeichnet werden. Diese porenbildenden Proteine regeln z.B. die Membranpermeabilität und erlauben es niedermolekularen Stoffen, die Membran durch passive Diffusion zu passieren. Auch die antimikrobielle Wirkung von Defensinen beruht im Allgemeinen auf einer Membrandesintegration.

5.4 Funktionelle Charakteristika von hBD-1

Die antimikrobiellen Hemmtests zeigen eindeutig, dass hBD-1, ähnlich wie andere Säugerdefensine, als Breitbandantibiotikum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie Hefen wirkt [Eisenhauer *et al.*, 1992, Selsted *et al.*, 1992; Lehrer *et al.*, 1993]. hBD-1 kann das Wachstum von Mitgliedern verschiedener taxonomischer Familien inhibieren, aber die antimikrobielle Effizienz differiert sehr stark, selbst innerhalb des selben Genus. Im Vergleich zu HNP-2 und anderen Referenzpeptiden war die antimikrobielle Aktivität gegen alle getesteten Mikroorganismen generell schwach, ausgenommen für Bacilli und für *Staphylococcus carnosus*.

Nach derzeitiger Auffassung beruht die antimikrobielle Wirkung von Defensinen auf einer Membranesintegration. Für diese Interaktion mit negativ geladenen Bereichen der Membranoberfläche sind polykationische Aminosäuren notwendig. hBD-1 besitzt nur einige basische Aminosäuren, was eine Erklärung für die im Vergleich zu HNP-2 geringe antimikrobielle Potenz sein mag. Bei ca. 30 % (3 von 11) der getesteten Mikroorganismen wurde unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine Wachstumshemmung durch hBD-1 bewirkt. Interessanterweise war der Prozentsatz nicht inhibierter Keime bei HNP-2 ebenso hoch (Abb. 4.7 und Tab. III). Entweder war die Konzentration des Antibiotikums zu niedrig, oder die Keime waren resistent. Allerdings ist die Resistenzbildung gegenüber endogenen Peptidantibiotika bislang selten beobachtet worden [Hancock & Lehrer, 1998].

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Platteninhibitionsassays, die einen Vergleich mit den Referenzpeptiden HNP-2, Magainin-II und Casocidin-I erlauben, lässt sich abschätzen, dass die minimale Konzentration zur Wachstumsinhibition von Mikroorganismen im Bereich von 3 - 25 µg/ml anzusetzen ist. Die im nanomolaren Bereich (ng/ml) liegenden Konzentrationen von hBD-1 im Urin sind deutlich unterhalb dieses Wertes. Deshalb erscheint die antimikrobielle Abwehr direkt auf die unmittelbare Umgebung der Syntheseorte begrenzt zu sein, wo entsprechend hohe lokale hBD-1-Konzentrationen auftreten können.

Gleiches gilt auch für die HNPs. Unter physiologischen Bedingungen sind die Plasma-Defensin-Konzentrationen (α -Defensine) kleiner als 10^{-7} M [Panyutich *et al.*, 1993; Ihi *et al.*, 1997]. Diese Konzentrationen sind deutlich unterhalb der Grenze, die *in vitro* notwendig sind, um die nutzbringenden, antimikrobiellen Effekte der Defensine oder ihre

potentiell schädlichen, zytotoxischen Wirkungen auszulösen. Nach Ihi *et al.* (1997) sind die Defensinkonzentrationen innerhalb von Neutrophilen mit ca. 6 mg/ml außerordentlich hoch. Diese Zahlen lassen vermuten, dass Defensine bei sehr hohen lokalen Konzentrationen wirken und nicht, wenn sie sich frei im Plasma befinden.

In vielen Fällen ist es schwer, im Wirtsorganismus bakterizide Konzentrationen eines Antibiotikums zu erreichen. Außerdem wirken einige Antibiotika per se nur bakteriostatisch. Aber auch subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika können wirksam sein, wie z.B. die verminderte Infektanfälligkeit von Tieren zeigt, die Antibiotika in leistungsfördernden Dosen erhalten. In solchen Fällen hat man im Elektronenmikroskop kleine strukturelle Änderungen in den Bakterien entdeckt und zudem festgestellt, dass sie besser phagozytiert werden. Es genügt also oft, die Chancen der Abwehr nur ein wenig zu erhöhen, um den Angreifer zu inaktivieren. Schon die Veränderung der Bakterienmembran durch die Anlagerung von hBD-1 könnte genauso wirken. In diesem Falle wäre es eine Aufgabe von hBD-1 Mikroorganismen für eine Eliminierung durch neutrophilengestütztes HNP vorzubereiten.

Herausragendes Charakteristikum von hBD-1 ist die mit Selektivität gepaarte Universalität der antimikrobiellen Aktivität. Eine Synopsis der vorhandenen Daten belegt einerseits das breitgefächerte Wirkungsspektrum dieses Peptids, auf der anderen Seite wirkt hBD-1 unter gegebenen Bedingungen nur gegen einzelne Keime. Der protektive Wert von hBD-1 ist weiterhin bestimmt durch seine hohe Salzeempfindlichkeit. Als eine Konsequenz dieser Salzsensitivität wird spekuliert, dass die Funktion von hBD-1 bei Cystischer Fibrose aufgrund der abweichenden Ionenkomposition in der Lunge dieser Patienten eingeschränkt ist, was zu chronischen Infektionen der Atemwege führt [McCray *et al.*, 1997]. Der Einfluss von Salz auf die Interaktion von Defensinen mit Bakterienmembranen wird durch die Beobachtung bestätigt, dass hohe Salzkonzentrationen durch HNP verursachte ultrastrukturelle Veränderungen auf bakteriellen Oberflächen verhindern können [Shimoda *et al.*, 1995].

hBD-1 wird an den verschiedensten epithelialen Barrieren in Lunge, Leber, Niere, Darm, Pankreas, etc. gebildet, wo die luminalen Räume zudem mit vom Blut verschiedenen Flüssigkeiten gefüllt sind. Vorausgesetzt hBD-1 entfaltet seine Aktivität *in vivo* in diesen Mikrokompartmenten, ist hBD-1 mit residenten Kommensalen und einer Vielzahl von Pathogenen, zum Teil mit spezifischen Affinitäten zu bestimmten Geweben, konfrontiert. hBD-1 wird auch an Orten synthetisiert, wo Salzkonzentrationen von 100 mM oder mehr

Im Einklang damit steht die Beeinflussbarkeit der antimikrobiellen Aktivität von hBD-1 durch die Eigenschaften des umgebenden Mediums (Hydrophobie, Salz- und Wasserstoffionenkonzentration). Das gilt auch für andere Mitglieder dieser Peptidfamilie, wie die nachfolgenden Beispiele illustrieren.

So ist die antimikrobielle Wirkung des intestinalen α -Defensins HD 5 gegenüber *Listeria monocytogenes* bei pH 7,4 ausgeprägter als bei pH 8,5, wohingegen das Wachstum von *Salmonella typhimurium* stärker bei pH 8,5 gehemmt wird [Porter *et al.*, 1997]. Obwohl intaktes Big Defensin antibakteriell gegen *Salmonella typhimurium* und *Staphylococcus aureus* wirkt, ist das N-terminale hydrophobe Fragment von AS 1 bis 37 wirksamer gegen Gram-positive Bakterien, und das C-terminale Fragment von AS 38 bis 79 wirkt effektiver gegen Gram-negative Bakterien [Kawabata & Iwanaga, 1997].

Das elektrische Potential von Mikrobenmembranen wird durch externe elektrostatische Einflüsse ebenfalls moduliert. Weiter konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert bei bestimmten Mikroorganismen Einfluss auf die DNA-Topologie und die Expression von Defensinresistenz bewirkende Virulenzgene haben kann [Miller *et al.*, 1990; Karem & Foster, 1993; Bearson *et al.*, 1996]. Die Aktivitätsänderungen von hBD-1 können also sowohl auf der Modifikation des Peptides als auch auf der der Mikroben beruhen.

Defensine sind nicht nur antimikrobiell wirksame Peptidantibiotika. Einige dieser Peptide entfalten zusätzliche Funktionen (siehe auch Abschnitt 1.2.6). Defensine werden bei Säugern exprimiert, ohne die Wirtszellen selbst zu schädigen [Jones & Bevins, 1992; Stolzenberg *et al.*, 1997; Darmoul *et al.*, 1997]. Dennoch wurde in *In-vitro*-Studien in einzelnen Fällen beobachtet, dass sich das antibiotische Potential von Defensinen auf Säugerzellen erstreckt [Lehrer *et al.*, 1993]. Das, wenn auch geringe, zytotoxische Potential von hBD-1 beruht möglicherweise darauf, dass Defensine die Möglichkeit haben, mit Membranen der Wirtszellen zu interagieren um Anionen-konduktive Poren zu formen [Kagan *et al.*, 1990; Cociancich *et al.*, 1993]. So konnte zum Beispiel kürzlich der Einfluss muriner Cryptdine auf die Chloridsekretion von intestinalen Zellen gezeigt werden [Lencer *et al.*, 1997]. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften ist anzunehmen, dass hBD-1 diese Funktion teilt, wobei das Salz im Kulturmedium keinen bedeutsamen Einfluss zu haben scheint. Die Zytotoxizität lässt sich unter der Annahme eines lethalen Ausmaßes der Membranpermeabilisation bei höheren hBD-1-Konzentrationen erklären.

Auch wenn die antibiotische Wirkung von Defensinen im wesentlichen in der Hemmung von Membranfunktionen beruht, können darüber hinaus nach der Aufnahme von Defensinen ins Zellinnere auch die DNA- und Proteinsynthese beeinträchtigt werden [Bateman *et al.*, 1991]. So können Defensine direkt an der DNA agieren, indem sie hier zu Einzelstrangbrüchen führen [Gera & Lichtenstein, 1991]. Da die DNA in Bakterien- und Säugerzellen gleichartig ist, sind interkalierende Antibiotika auch für Eukaryonten toxisch. Vorausgesetzt hBD-1 gelänge in den Kern, wäre eine Intervention an der DNA denkbar, da die Oberfläche des DNA-Moleküls wegen der Zucker- und Phosphat-Reste des Rückgrats polar und negativ geladen ist. Kationische Defensine könnten, wie auf negativ geladenen Mikrobenmembranen, durch elektrostatische Kräfte auf die DNA einwirken. Dass Defensine *in vivo* im Zellkern lokalisiert sind, zeigt die Identifikation von HNP-1 bis 3 im Zellkern von humanen Lymphozyten [Blomqvist *et al.*, 1999]. Aber, die für die Auslösung der zytotoxischen Aktivität erforderlichen hohen Konzentrationen, die lange Latenzzeit und eine möglicherweise notwendige Prädisposition der Zellen sprechen dafür, dass hBD-1 kein potentes Akutgift für Säugerzellen darstellt. Die Beobachtung, dass eine hohe Serumproteinkonzentration den zytotoxischen Effekt unterdrücken kann, steht in Übereinstimmung mit früheren Befunden, dass Defensine durch einige Plasmaproteine gebunden und inaktiviert werden können [Ganz & Lehrer, 1995]. Z.B. blockiert der α -1-Proteinase-Inhibitor, ein gut charakterisierter Inhibitor der Neutrophilen Elastase, die zytotoxischen und stimulatorischen Aktivitäten von Defensinen auf epitheliale Zellen [Hiemstra *et al.*, 1998].

Abgesehen von einem kürzlich beschriebenen Potential als Schutzsubstanz gegen adenovirale Infektionen [Gropp *et al.*, 1999] konnten wir weder in eigenen, hier nicht gezeigten, Experimenten (Trypsininhibition, Chemotaxis, LPS-Bindung) noch in der Literatur Hinweise über weitere biologische Aktivitäten von hBD-1 erhalten. Dies grenzt hBD-1 gegenüber anderen Defensinen, insbesondere den humanen α -Defensinen, ab. hBD-1 scheint also in erster Linie ein antimikrobielles Agens zu sein. Sekundäre Eigenschaften wie z.B. Zytotoxizität gegenüber Säugerzellen und weitere bisher nicht beobachtete Funktionen sind vermutlich Nebenwirkungen, wie sie bei anderen Medikamenten auftreten. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Funktionen von hBD-1, ebenso wie die antimikrobielle Aktivität, erst unter speziellen *In-vivo*-Bedingungen zu Tage treten. Neueste Untersuchungen

ergeben erste Hinweise, dass α -Defensine z.B. mittels Induktion von Sauerstoffradikalen das Milieu ihrer Umgebung direkt beeinflussen können. So wird diskutiert, dass Neutrophile durch die Freisetzung von HNP die Umweltbedingungen (Milieu) derart beeinflussen, dass dadurch optimale Bedingungen zur Ausübung ihrer antimikrobiellen Funktion entstehen [Kaplan *et al.*, 1999]. Möglicherweise sind noch weitere unbekannte Synergismen oder Wechselwirkungen für die Ausprägung der jeweiligen Funktionen der Defensine verantwortlich, wie es die Ergebnisse von Bals *et al.* (1998) bei Untersuchungen von hBD-2 nahelegen.

Die gezeigten Daten lassen ableiten, wie sehr die biologischen Aktivitäten der Defensine multifaktoriellen Einflüssen unterliegen. Zur vollständigen Aufklärung der funktionellen Charakteristika von hBD-1 und anderen humanen Defensinen bedarf es zukünftig weiterer Untersuchungen, die bislang durch die begrenzte Menge an verfügbarem Peptid limitiert waren. Eine detaillierte Suche nach putativen Funktionen sowie die erschöpfende antimikrobielle Austestung jeder einzelnen Defensinvariante sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

5.5 Intestinale Defensine

Die weitverbreitete Expression von humanen α - und β -Defensinen, ihre vielfältigen Eigenschaften und die aufgrund ihrer geringen Molekülgröße schnelle Synthese charakterisieren diese Peptide als wichtige Komponenten der unspezifischen Immunabwehr an allen epithelialen und mukosalen Barrieren [Boman, 1995 und 1998]. Ein Großteil der Exposition mit Mikroorganismen erfolgt im Gastrointestinaltrakt, wobei die bakterielle Exposition im oberen Gastrointestinaltrakt häufig in Zusammenhang mit der Einnahme von Nahrung erfolgt, während im Dickdarm eine große und komplexe Population einer Spezies-spezifischen Flora von Bakterien residiert. Im Vergleich zum Dickdarm ist das Lumen des Dünndarms weniger dicht besiedelt. Um die relativ geringe Bakterienzahl im Dünndarm zu erhalten und gleichzeitig die nutzbringende Mikroflora im Dickdarm aufrechtzuerhalten, ist eine differenzierte Reaktion auf Mikroorganismen erforderlich.

Die Lokalisation von HD 5 in intestinalen Paneth Zellen, die Detektion von HD 6-Transkripten in verschiedenen Darmabschnitten sowie die Infiltration und Aktivierung von α -Defensin enthaltenden Neutrophilen im Verlauf von intestinalen Erkrankungen zeigen, dass α -Defensine bei der Mikrobenabwehr im Gastrointestinaltrakt beteiligt sind [Jones & Bevins, 1993; Porter *et al.*, 1997]. Die Existenz der intestinalen Defensine HD 5 und HD 6 legt die Vermutung nahe, dass diese Peptide als Bestandteile der antimikrobiellen Barrierefunktion der Dünndarmmukosa den Dünndarm vor einer bakteriellen Überwucherung durch eine autochthone Flora und vor einer Invasion durch oral aufgenommene, potentiell infektiöse Pathogene schützen. Eine limitierte Expression dieser Defensine würde das Risiko einer bakteriellen Invasion des Intestinums erhöhen und ist ein Faktor in der Pathophysiologie gastrointestinaler Erkrankungen. Salzman und Mitarbeiter (1998) berichten z.B. über einen Zusammenhang zwischen der Expression intestinaler Defensine und nekrotisierender Enterocolitis, einer schweren Erkrankung des terminalen Ileums, die speziell Frühgeborene betrifft. Die geringe Anzahl humaner intestinaler Defensine (siehe auch Abschnitt 5.2) und ihr vorwiegendes Vorkommen im Dünndarm führt zu der Frage, ob diese Peptide einen ausreichenden antimikrobiellen Schutz im Gastrointestinaltrakt, insbesondere im Dickdarm, bilden.

Die Konfiguration der β -Defensine entspricht der charakteristischen Schwefelbrückenkonfiguration von Trefoil-Peptiden. Mitglieder der Trefoil-Peptidfamilie

werden im Gastrointestinaltrakt von Säugern sowohl im Darm als auch im Pankreas von Mukus-sezernierenden Zellen produziert [Sands & Podolsky, 1996]. Die kompakte Struktur des Trefoil-Motives ist wahrscheinlich verantwortlich für die bemerkenswerte Stabilität von Trefoil-Peptiden gegen proteolytische Verdauung. Dies befähigt sie, im ungünstigen Mikrobiotop in den Räumen des gastrointestinalen Lumens zu funktionieren. Trefoil-Peptide werden, ähnlich wie hBD-2 [Bals *et al.*, 1998], angrenzend an entzündete Bereiche innerhalb des Gastrointestinaltraktes exprimiert und spielen eine wichtige Rolle sowohl in der Aufrechterhaltung der Barrierenfunktion von mukosalen Oberflächen als auch bei der Förderung der Wundheilung nach Verletzungen.

Das Expressionsmuster humaner β -Defensin-mRNA, die in dieser Arbeit beschriebene zelluläre Lokalisierung des korrespondierenden hBD-1-Peptids im Gastrointestinaltrakt sowie die hohe Stabilität von hBD-1 gegenüber proteolytischem Verdau spricht dafür, dass hBD-1 in der proteasereichen Umgebung des Intestinaltraktes eine entsprechende wichtige Funktion zukommt.

5.5.1 Defensine im Pankreas

Mittels immunhistologischer Methoden wurde hBD-1 im Rahmen dieser Arbeit im Pankreas von gesunden und erkrankten Personen in Azinuszellen und in Epithelzellen der Pankreasgänge lokalisiert. *In-situ*-Hybridisierungsexperimente von Schnapp *et al.* (1998) an fötalem und adultem Pankreasgewebe zeigen, dass auch die korrespondierende hBD-1-mRNA in Azinuszellen exprimiert wird. In den Gangepithelzellen wurde jedoch keine Expression gefunden. Diese Diskrepanz zu unseren Ergebnissen lässt sich vermutlich durch die von uns gezeigte interindividuelle Variabilität der hBD-1-mRNA-Expression und der hBD-1-Peptid-Translation erklären.

Ähnlich wie bei der Niere, wo hBD-1-Transkripte hauptsächlich in den distalen Tubuli und den Verbindungsstücken lokalisiert ist [Valore *et al.*, 1998, Zucht *et al.*, 1998], die als erster Teil des Organs durch aufsteigende Infektionen betroffen wären, könnte hBD-1 in der Bauchspeicheldrüse dazu dienen, das Gangsystem und die Azini vor retrograden Infektionen zu schützen. Tatsächlich sind aus dem Duodenum aufsteigende Gram-negative Bakterien die Hauptursache bei pankreatischen Infektionen, einer ernsten Komplikation der schweren akuten Pankreatitis [Hayashi *et al.*, 1996]. Die Azinuszellen sind die primären proteinsezernierenden Zellen des exokrinen Pankreas. Das Pankreassekret enthält neben einer

Batterie von Verdauungsenzymen antimikrobielle Komponenten [Elmes, 1976]. Ob Azini hBD-1 über die Pankreasgänge in das Duodenum sezernieren, muss durch weiterführende Analysen direkt von Pankreassekret geklärt werden. Auf diese Weise könnte hBD-1 durch Erhöhung von Konzentration und Vielfalt der Defensine dazu beitragen, die geringe Menge von α -Defensin-produzierenden Paneth Zellen im Duodenum zu kompensieren, und dem Schutz der Bauchspeicheldrüse und des proximalen Dünndarms vor einer bakteriellen Invasion dienen [Pierzynowski *et al.*, 1993].

Bakterielle Infektionen führen selten zu einer symptomatischen Pankreatitis [Steinberg *et al.*, 1994]. In dieser Studie wurde tendenziell die höchste Expression von hBD-1 im Pankreas der Patienten mit histologisch unauffälligem, d.h. gesundem Gewebe gefunden. Das lässt den Schluss zu, dass hBD-1 als physiologischer Schutz der Bauchspeicheldrüse gegen Infektionen und den daraus resultierenden Schäden wirkt: Niedrige hBD-1-Spiegel könnten eine Ursache von abhängigen pankreatischen Erkrankungen sein. Bisher ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Diagnose und hBD-1-Expression herstellen. Das deutet darauf hin, dass das Ausmaß einer hBD-1-Aktivierung oder -Deaktivierung nicht einfach mit der Pathogenese der Erkrankung im Zusammenhang steht. Das Fehlen einer Korrelation zwischen der hBD-1-mRNA-Expression und systemischen inflammatorischen Indikatoren wie der Erhöhung der Leukozytenzahl oder der Serumamylase-Aktivität ist konsistent mit der Tatsache, dass die hBD-1-Expression, im Gegensatz zu hBD-2, nicht durch inflammatorische Mediatoren wie $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ oder Lipopolysaccharide induzierbar ist [Singh *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 1998; Bals *et al.*, 1998].

Der Befund, dass hBD-1 in Zellen von gesunden und erkrankten Personen vorkommt, weist darauf hin, dass hBD-1, zusätzlich zur Abwehr pathologischer Mikroorganismen, eine physiologische Rolle haben kann. Dass hBD-1 in fötalem Pankreas in einem Entwicklungsstadium exprimiert wird, in dem die inneren Organe noch keinen externen Pathogenen ausgesetzt werden, unterstützen die Hypothese von einer weiteren physiologischen Funktion von hBD-1 [Schnapp *et al.*, 1998]. Es ist denkbar, dass hBD-1 als Mediator z.B. mittels Apoptose-Induzierung, Zytorrhise oder Zellmobilisierung an Wundheilungsprozessen beteiligt ist und dadurch zur Integrität epithelialer Zellverbände beiträgt.

5.5.2 Defensine im Darm

Die Entdeckung von hBD-1 in Zellen des Darmepithels von Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen zeigt, dass neben den bereits bekannten intestinalen α -Defensinen auch β -Defensine einen Beitrag zur Schutzfunktion der Darmwand leisten können. Bei Neutrophileninfiltration, Entzündung und weiteren Faktoren finden sich im Gastrointestinaltrakt alle heute bekannten humanen Defensine. Die im Pankreas beobachtete interindividuelle Variabilität der hBD-1-Verteilung wird durch die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung von Darmgewebe bestätigt.

hBD-1 wurde speziell im Kolon einer Patientin mit eosinophiler Enteritis gefunden. Lokalisiert wurde das Peptid hier im basalen Zellpol von Becherzellen. Gewebeschnitte dieser Patientin sind gekennzeichnet durch pathologische Veränderungen der epithelialen Krypten (Abb. 4.21), begleitet von einer erhöhten Anzahl von Becherzellen (Abb. 4.18). Hinzu kommt eine massive Infiltration des Gewebes durch HNPs-enthaltende Neutrophile (Abb. 4.21). Diese Befunde zeigen, dass die Defensine bei der Pathogenese von Darmveränderungen involviert sind. Myeloide α -Defensine modulieren das Zellvolumen in intestinalen und renalen Epithelien und beeinflussen die Integrität epithelialer Barrieren in Zellkulturen [MacLeod *et al.*, 1991; Peterson *et al.*, 1995; Bateman *et al.*, 1996]. Ob hBD-1 entsprechende Funktionen im humanen Darm erfüllt, bleibt eine offene Frage.

Im Gegensatz zum oben genannten Gewebe konnte im Kolon eines Organspenders keine klare subzelluläre Zuordnung von hBD-1 erfolgen. Hier zeigt das Muster der Immunfärbung eher eine unspezifische Reaktion auf hBD-1 im mukosalen Epithel (Abb. 4.20). Interessanterweise zeigt die Lokalisation von hBD-2 mittels *In-situ*-Hybridisierung im Kolon und Pankreas ein ähnliches Bild [Bals *et al.*, 1998]. Auch hier ist das Signal für die hBD-2-mRNA diffus über Epithel- bzw. Azinuszellen verteilt.

Zusätzlich waren bei diesem Gewebe vereinzelte Zellen innerhalb der Lamina propria hBD-1-immunreaktiv. Möglicherweise handelt es sich um eine Subpopulation von Neutrophilen, die bereits hBD-1-beladene Mikroorganismen phagozytiert haben. Zu den Präparaten stehen keine bakteriologischen Befunde zur Verfügung, um diese Beziehung nachzuweisen.

Die hBD-1-spezifische Immunfärbung im Kolonepithel ergab keine Hinweise für eine Sekretion des Peptides. Wenn hBD-1 nicht in das Darmlumen sezerniert wird, um die

residente Mikrofauna vor seiner bakteriziden Aktivität zu schützen, könnte hBD-1 seine Funktionen intrazellulär ausüben, wenn eine bakterielle Invasion des Epitheliums auftritt. Die Aufgabe von hBD-1 im Konzert der anderen Defensine sehen wir in der Inhibition einer mikrobiellen Kolonisation des Epithels, die gleiche Rolle, die auch für Paneth Zell-Defensine angenommen wird [Ouellette, 1997]. Obwohl der angenommene bioaktive Kern von Defensinen sehr resistent gegen intestinale Proteasen ist, wird angenommen, dass β -Defensine nicht im Lumen agieren [Bals *et al.*, 1998; Zucht *et al.*, 1998]. Die hohe Salzeempfindlichkeit von hBD-1 würde aufgrund der hohen Salzkonzentrationen im intestinalen Lumen zu einem Verlust der antimikrobiellen Eigenschaften führen. Zudem konnten wir in vorläufigen Experimenten mit massenspektroskopischen Methoden keinen Nachweis von hBD-1 in Stuhlproben erbringen (unveröffentlichte Daten), wie er in Urin und Blut routinemäßig gelingt.

Die Präsenz der bekannten humanen Defensine im Epithel des Gastrointestinaltraktes impliziert, dass diese multifunktionalen Peptide aufgrund ihrer individuellen Fähigkeiten bestens geeignet sind, eine schnelle, differenzierte und adäquat abgestufte Antwort des mukosalen Immunsystems auf möglicherweise schädliche Mikroorganismen zu geben. Epithel- und Paneth Zellen gehören zu den ersten Zellen, die sich mit fremden Antigenen auseinandersetzen müssen; Neutrophile repräsentieren die erste Linie von Abwehrzellen, die während eines entzündlichen oder infektiösen Prozesses in der Mukosa erscheinen. Die Lokalisation von HD 5 und HD 6 in den ilealen Paneth Zellen prädestiniert die α -Defensine für die Wirtsverteidigung im Dünndarm [Jones & Bevins, 1993].

Im Dickdarm könnte diese Aufgabe von dem in den Becherzellen produzierten β -Defensin hBD-1 übernommen werden. Bemerkenswerterweise stammen Paneth- und Becherzellen, wie auch Enterozyten und enterochromaffine Zellen, von gemeinsamen intestinalen Stammzellen ab. Da die α -Defensin-enthaltenden Neutrophilen Zugang zu allen vaskularisierten Geweben haben, dürften die HNPs zur systemischen Wirtsverteidigung beitragen [Ganz & Lehrer, 1995], während β -Defensine für lokale Besonderheiten zuständig sind.

Die gewebespezifischen, gewöhnlich nicht überlappenden Verbreitungen und Aktivitäten von humanen α - und β -Defensinen lassen damit die Annahme zu, dass diese Substanzen verschiedene Rollen mit spezifischen Tropismen bei der angeborenen Wirtsverteidigung innehaben [Zhao *et al.*, 1996; Lillard *et al.*, 1999]. Weil eine Migration von Neutrophilen ins Gewebe im Verlauf von Erkrankungen und nicht bei Gesunden erfolgt, entfalten HNPs vorrangig ihre Wirkung unter pathologischen Konditionen.

Das Verteilungsmuster der β -Defensine hBD-1 und hBD-2 sowie deren beschriebene bakterizide Kapazitäten implizieren, dass ihre primäre Aufgabe in der permanenten Bereitstellung eines antimikrobiellen Schutzschildes an Körperöffnungen und epithelialen Barrieren besteht [Zhao *et al.*, 1996; Bals *et al.*, 1998]. Auf der anderen Seite verweist das unterschiedliche Expressionsverhalten von hBD-1 und hBD-2 auf eine differente, gewebespezifische Aufgabenteilung bei der Bewältigung infektiöser oder inflammatorischer Zustände [Lui *et al.*, 1998; Bals *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998].

Welche Rolle die einzelnen Mitglieder der Defensinfamilie letztendlich ausfüllen, ist in weiteren Studien zu klären. Aufgrund der hier vorgelegten Daten lässt sich folgende Hypothese ableiten: Beide Subfamilien, α und β , tragen in komplementärer Art und Weise zur Abwehr von Mikroorganismen und zur Wahrung der Integrität mukosaler und epithelialer Körperbarrieren bei. hBD-1 und andere Epithelzell-assoziierte Defensine (hBD-2, HD 5, HD 6) wehren in erster Linie penetrierende Bakterien ab, wogegen die HNPs diejenigen Bakterien neutralisieren, die diese vorderste Verteidigungsbarriere überwinden.

5.6 Defensine: Endogene Peptidantibiotika als Immunmodulatoren

Die weitverbreitete Expression von humanen α - und β -Defensinen, ihre vielfältigen Aktivitäten und die schnelle Synthese zeigen, dass diese Peptide wichtige Komponenten der unspezifischen Immunantwort an allen epithelialen und mukosalen Körperbarrieren sein können [Bomann, 1995]. Zusätzlich zur antimikrobiellen Funktion können Defensine Signale vermitteln, die angeborenes und erworbenes Immunsystem miteinander verbinden. In nanomolaren Konzentrationen sind Defensine (HNP-1 und HNP-2, aber nicht HNP-3) potente spezifische Chemoattraktanten für Monozyten [Territo *et al.*, 1989]. Die Freisetzung von Defensinen durch Neutrophile kann somit zur lokalen Ansiedlung von Monozyten in infizierten oder entzündeten Bereichen beitragen. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Anwesenheit dieser multifunktionalen Peptide in der intestinalen Mukosa möglicherweise die angeborene Immunreaktion gegen fremde Antigene auslösen kann [Lillard *et al.*, 1999]. Defensine in der Darmschleimhaut fördern wahrscheinlich die erworbene systemische Immunantwort, ohne initial das komplette Repertoire der mukosalen Immunität zu induzieren. Die immunregulatorischen Eigenschaften von Defensinen bewirken damit, dass Krypten und Paneth Zellen Pathogene und Kommensalen in mukosalen Kompartimenten enthalten (internalisieren) können, ohne eine überschießende mukosale Immunreaktion auszulösen, wenn körperfremde Agenzien mit der Mukosa zusammenstoßen. Entsprechend würden diese Mechanismen den Defensinen erlauben, die Ag-spezifische Reaktion gegen Mikroben, die das sterile periphere Umfeld erreichen, merklich zu steigern. Eine derartige Immunregulation durch wirtseigene Faktoren ist nicht ungewöhnlich. So regulieren zum Beispiel Neuropeptide die Immunglobulin-Produktion und die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation in einer gewebespezifischen Art und Weise [Payan *et al.*, 1983; Ottaway & Greenberg, 1984]. Sebastiano *et al.* (1999) zeigen, dass Substanzen aus intestinalen Nerven Einfluss auf die Reaktion von Immunzellen haben. Sie beobachteten bei Patienten mit histologisch unauffälligem Appendix trotz diagnostizierter akuter Blinddarmentzündung erhöhte Konzentrationen von Neuropeptiden wie Substanz P und VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) in Verbindung mit einer Neuroproliferation.

Bei Säugetieren sind alle bislang bekannten Defensine in Phagozyten und/oder Epithelien lokalisiert. Beide Zelltypen spielen eine Rolle bei der Immunmodulation und sind direkt in die Parasitenabwehr involviert. Leukozyten sind als wichtige Effektorzellen im

Rahmen von infektiös-entzündlichen Vorgängen der Haut und der respiratorischen Schleimhaut etabliert. So konnte z.B. gezeigt werden, dass α -Defensin-enthaltende Neutrophile (Mikrophagen) bei Pneumonien im Rahmen der Cystischen Fibrose eine Rolle spielen [McCray *et al.*, 1996], und erhöhte Konzentrationen von eosinophilen Granulozyten bzw. ihren Mediatoren (z.B. eosinophile kationische Proteine) finden sich bei Patienten mit Asthma und anderen allergischen Reaktionen [Bousquet *et al.*, 1990; Bischoff *et al.*, 1996]. Zudem ist die Eosinophilie bei der Abwehr von mehrzelligen Parasiten (z.B. Wurminfektionen) und bei der Pathophysiologie entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt [Levy & Kita, 1996; Bischoff *et al.*, 1997]. α -Defensine aus Neutrophilen induzieren die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und tragen so zur Verbindung der Stoffwechselwege von Infektionsabwehr und akut entzündlichen Prozessen bei [Befus *et al.*, 1999].

Epithelien sind, wie auch neuere Studien zeigen, fähig, eine Reihe von biologisch hochaktiven Mediatoren und Zytokinen (z.B. IL-1, IL-8, TNF, hBD-1, hBD-2) zu synthetisieren. Diese Befunde bedeuten, dass Epithelzellen eine wichtige Rolle als immunregulatorische Zellen bei Immun- und Entzündungsreaktionen spielen können. Auf welche Weise Epithelien in das Netzwerk von Infektionen, Entzündungen und Immunantwort eingebunden sind, ist kompliziert und in den einzelnen Zusammenhängen schwierig zu erklären.

Auf der Grundlage von veröffentlichten Daten und der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lässt sich folgern, dass Defensine mit ihren molekularen Varianten in ein Netzwerk eingebunden sind, das Bestandteil der Immunabwehr ist. Es ergänzt damit die systemische Abwehr (phagozytierende Zellen, Hormone sowie Komplementsystem) und die spezifische Abwehr mit Antikörpern. Schematisch kann das Netzwerk der nachgewiesenen und potentiellen Aktivitäten und Verknüpfungen humaner Defensine an Körperbarrieren zusammenfassend dargestellt werden (Abb. 5.6), ein Konzept, das in den kommenden Jahren sicher immer wieder überarbeitet werden muss.

DEFENSIN-NETZWERK

Hypothetische Aktivierungs- und Regulationsmechanismen an epithelialen Barrieren

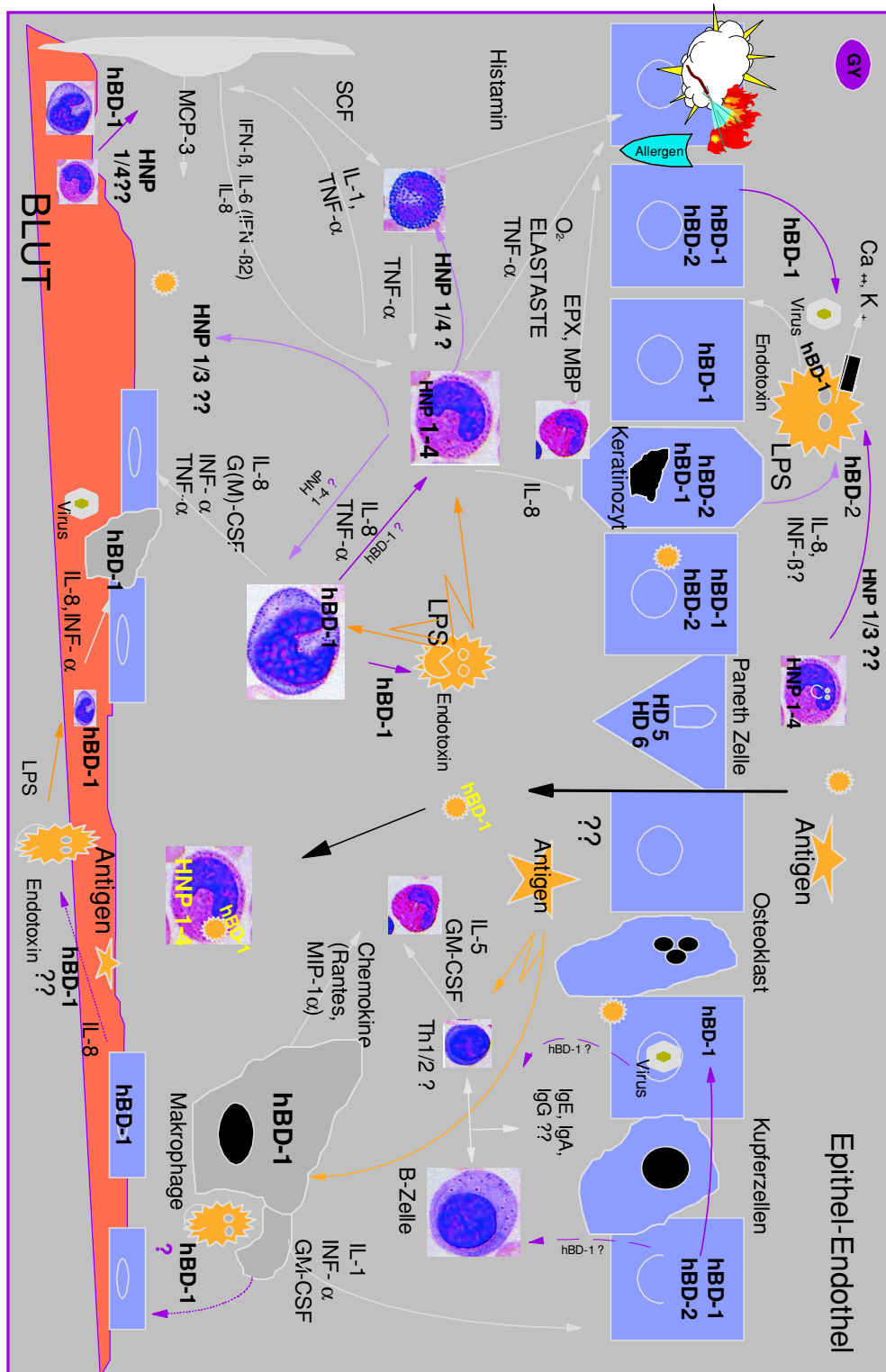


Abb. 5.6: Schematische Darstellung eines hypothetischen Netzwerks der humanen Defensine. Die Abbildung illustriert die Vorstellungen des Autors über die Einbindung endogener antibiotischer Peptide in die komplexen Abläufe von inflammatorischen, allergischen und infektiösen Prozessen.

5.7 Epilog

Die Existenz von zahlreichen Homologen der endogenen antibiotischen Peptide in verschiedenen Tierstämmen belegt, wie verbreitet diese primäre, sauerstoffunabhängige Verteidigungsstrategie im Tierreich ist und verdeutlicht die evolutionäre Relevanz der antimikrobiellen Peptide, ähnlich den Stoffgruppen wie Immunmodulatoren, Cytokine und Chemokine. Antimikrobielle Peptide kommen präferenziell an Orten vor, die in Kontakt mit unserer mikrobebeladenen Umwelt stehen. Sie haben ein breitgefächertes antimikrobielles Wirkungsspektrum und zeigen ein außerordentlich flexibles Aktivitätspotential in Bezug auf ihren Wirkort und die Zielorganismen. Von wichtiger Bedeutung ist die Entdeckung, dass einige dieser Peptide induzierbar sind. Diese Fakten tragen wesentlich zu der Überzeugung bei, dass die kationischen antimikrobiellen Peptide enorme Vorteile im Überlebenskampf höherer Organismen in einer Welt voller Mikroorganismen bedeuten.

Im Zuge der generellen Kommerzialisierung der Biowissenschaften haben Anwendungsaspekte dieser Substanzen bei klinisch infektiösen Erkrankungen eine wesentliche Bedeutung erlangt. Antibiotikaresistente Bakterien sind ein Hauptproblem der menschlichen Gesundheit geworden und in der Landwirtschaft sind mikrobiell bedingte Erkrankungen im großen Maße verantwortlich für Produktionsausfälle bei Agrargütern. Die Entdeckung neuer antibiotischer Familien bietet die Chance, solche Probleme zu umgehen, und antimikrobielle Peptide könnten einen neuen Typ von antibiotischen Wirkstoffen repräsentieren. Lässt sich die Beteiligung von antimikrobiellen Peptiden an Entzündungsprozessen und Wundheilung bestätigen, können wir davon ausgehen, dass die pharmakologische Forschung in Zukunft neue therapeutische Prinzipien entwickeln wird, die auf der Stimulation endogener Peptidantibiotika basieren werden.

6.0 Zusammenfassung

Aus humanem Hämofiltrat hat unsere Arbeitsgruppe ein bislang unbekanntes 36 Aminosäuren langes Peptid mit Homologie zu bovinen β -Defensinen isoliert und als „humanes β -Defensin-1“ (hBD-1) bezeichnet [Bensch *et al.*, 1995]. Humane Defensine sind in zwei Subfamilien unterteilt: α - und β -Defensine. Bisherige Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass Defensine an der Bildung einer antimikrobiellen Barriere beteiligt sind. Ein direkter Beweis für eine solche Funktion der Defensine lag bislang nicht eindeutig vor [Schönwetter *et al.*, 1995]. Beim Menschen ist bisher die Existenz von 8 Defensinen bekannt: vier α -Defensine in Neutrophilen HNP-1 bis 4 [Ganz *et al.*, 1985; Wilde *et al.*, 1989], zwei weitere α -Defensine (HD 5 und HD 6) in ilealen Paneth Zellen [Jones & Bevins, 1992; Porter *et al.*, 1997] und zwei β -Defensine, hBD-1 und hBD-2, das in Keratinozyten der Haut identifiziert wurde [Harder *et al.*, 1997]. Im Zuge der humanen Genomanalyse wird sicher bald das gesamte Repertoire der Defensine bekannt sein, aber mit der Arbeit der funktionellen Analyse bleibt ein weites Feld offen.

Ziel dieses Unternehmens ist der Nachweis der biologischen Aktivität und der biologischen Funktion von hBD-1. Mittels *In-situ*-Hybridisierung und Immunhistologie wurde die Feinlokalisierung der Syntheseorte von hBD-1-Transkripten und der *In-vivo*-Translation in das korrespondierende Peptid im normalen und pathologischen Status vorgenommen. Es wurden Methoden entwickelt und optimiert, größere Mengen des Peptides herzustellen oder aus Körperflüssigkeiten zu isolieren. Im Verlauf dieser Arbeiten wurden neue molekulare Varianten des hBD-1 aus Blutfiltrat und aus Urin isoliert. Es ist gelungen, natives hBD-1 in hoher Ausbeute aus humanem Blutfiltrat und Urin zu isolieren. Mit dem isolierten hBD-1 wurden Maus-anti-hBD-1-Antiseren generiert und in immunhistologischen Studien eingesetzt.

Um den möglichen Ursprung von hBD-1 zu identifizieren, wurde die Verteilung von hBD-1-mRNA und hBD-1-Peptid in verschiedenen Geweben analysiert. Es zeigte sich, dass nahezu alle sekretorischen Gewebe hBD-1 exprimieren. Als Hauptexpressionsorte stellten sich die Niere und das Pankreas heraus. hBD-1-Transkripte wurden in den Tubuli der Niere lokalisiert. Das zugehörige Peptid konnte allerdings in den selben Zellen nicht nachgewiesen werden, da es dort nicht in ausreichenden Konzentrationen gespeichert ist. Im Gastrointestinaltrakt wurde das Peptid lokalisiert. hBD-1 ließ sich sowohl in histologisch unauffälligem als auch in pathologisch verändertem Gewebe detektieren. In der Bauchspeicheldrüse ist das Peptid in Azinuszellen und im Epithel der Pankreasgänge lokalisiert. Im Kolon findet sich das hBD-1-Peptid hauptsächlich in den

Becherzellen der Lieberkühnschen Krypten. Im Gegensatz hierzu ist HNP ausschließlich in infiltrierenden Zellen innerhalb der Lamina propria nachzuweisen.

Untersuchungen über die Funktion des hBD-1 im menschlichen Organismus zeigen, dass hBD-1 als Breitbandantibiotikum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie Hefen wirkt. Die antimikrobielle Effizienz differiert sehr stark, selbst innerhalb des selben Genus. Die hBD-1-Varianten unterscheiden sich im Wirkungsspektrum und -potential. Anders als bei den strukturell verwandten HNPs, die einer posttranslationalen Reifung unterliegen, scheint die antimikrobielle Aktivität von hBD-1 nicht direkt mit der Länge des N-Terminus korreliert zu sein. Die antimikrobielle Aktivität von hBD-1 wird durch die Wasserstoffionenkonzentration und den Salzgehalt des umgebenden Mediums moduliert und in Lösungen mit Salzkonzentrationen um 100 mM unterdrückt.

Molekulare Variation und physiko-chemische Modulation der Bioaktivität von humanen Defensinen tragen zur molekularen und funktionellen Diversifikation dieser Peptide bei. Durch die posttranslationale Generation von molekularen Defensin-Varianten aus jeweils einem einzigen Vorläufermolekül könnte eine große Anzahl funktioneller Defensine mit individuellen Eigenschaften freigesetzt werden. Die Erhöhung der Anzahl biologisch aktiver Substanzen durch posttranslationale Variantenbildung sowie die Modulation der Aktivität in Abhängigkeit von der Umgebung könnte Ausdruck einer evolutionären Entwicklung zur Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen sein und die Chancen des Wirtes zur erfolgreichen Abwehr verschiedenster Mikroorganismen der sich schnell verändernden Mikroflora erhöhen.

Abgesehen von einer begrenzten zytotoxischen Aktivität gegenüber Säugerzellen und einem kürzlich beschriebenen antiviralen Potential [Gropp *et al.*, 1999] konnten weder in eigenen Experimenten noch in der Literatur Hinweise über weitere biologische Aktivitäten von hBD-1 erhalten werden. Dies grenzt hBD-1 gegenüber anderen Defensinen, insbesondere den humanen α -Defensinen, ab. hBD-1 scheint also in erster Linie ein antimikrobielles Agens zu sein.

Aufgrund der hier vorgelegten Daten lässt sich folgende Betrachtung ableiten: Beide Subfamilien, α und β , tragen in komplementärer Art und Weise zur Abwehr von Mikroorganismen und zur Wahrung der Integrität mukosaler und epithelialer Körperbarrieren bei. hBD-1 und andere Epithelzell-assoziierte Defensine (hBD-2, HD 5, HD 6) wehren in erster Linie penetrierende Bakterien ab, wogegen die HNPs diejenigen Bakterien neutralisieren, die diese vorderste Verteidigungseinrichtung überwinden.

7 Literaturverzeichnis

1. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH: FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:195-199, 1995
2. Arnljots K, Sorensen O, Lollike K, Borregaard N: Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia* 12:1789-1795, 1998
3. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM: Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102:874-880, 1998
4. Bateman A, Singh A, Congote LF, Solomon S: The effect of HP-1 and related neutrophil granule peptides on DNA synthesis in HL60 cells. *Regul Pept* 35:135-143, 1991
5. Bateman A, Singh A, Shustik C, Mars WM, Solomon S: The isolation and identification of multiple forms of the neutrophil granule peptides from human leukemic cells. *J Biol Chem* 266:7524-7530, 1991
6. Bearson SM, Benjamin WH, Jr., Swords WE, Foster JW: Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 178:2572-2579, 1996
7. Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A: Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol* 163:947-953, 1999
8. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG: hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368:331-335, 1995
9. Bischoff SC: Mucosal allergy: role of mast cells and eosinophil granulocytes in the gut. *Baillieres Clin Gastroenterol* 10:443-459, 1996
10. Bischoff SC, Grabowsky J, Manns MP: Quantification of inflammatory mediators in stool samples of patients with inflammatory bowel disorders and controls. *Dig Dis Sci* 42:394-403, 1997
11. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, Maschek H, Stolte M, Gebel M, Manns MP: Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 28:1-13, 1996
12. Blomqvist M, Bergquist J, Westman A, Hakansson K, Hakansson P, Fredman P, Ekman R: Identification of defensins in human lymphocyte nuclei. *Eur J Biochem* 263:312-318, 1999
13. Boman HG: Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13:61-92, 1995
14. Boman HG: Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol* 48:15-25, 1998
15. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, Michel FB: Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 323:1033-1039, 1990
16. Brandstadter J, Rossbach C, Theres K: Expression of genes for a defensin and a proteinase inhibitor in specific areas of the shoot apex and the developing flower in tomato. *Mol Gen Genet* 252:146-154, 1996
17. Brockus CW, Jackwood MW, Harmon BG: Characterization of beta-defensin prepropeptide mRNA from chicken and turkey bone marrow. *Anim Genet* 29:283-289, 1998
18. Bruix M, Jimenez MA, Santoro J, Gonzalez C, Colilla FJ, Mendez E, Rico M: Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* 32:715-724, 1993

19. Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ: Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T- cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 271:2935-2940, 1996
20. Cociancich S, Dupont A, Hegy G, Lanot R, Holder F, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P: Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem J* 300:567-575, 1994
21. Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L: Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J Biol Chem* 268:19239-19245, 1993
22. Cociancich S, Goyffon M, Bontems F, Bulet P, Bouet F, Menez A, Hoffmann J: Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 194:17-22, 1993
23. Cornet B, Bonmatin JM, Hetru C, Hoffmann JA, Ptak M, Vovelle F: Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* 3:435-448, 1995
24. Daher KA, Lehrer RI, Ganz T, Kronenberg M: Isolation and characterization of human defensin cDNA clones [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Jan; 86(1):342]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7327-7331, 1988
25. Darmoul D, Brown D, Selsted ME, Ouellette AJ: Cryptdin gene expression in developing mouse small intestine. *Am J Physiol* 272:G197-G206, 1997
26. Darmoul D, Ouellette AJ: Positional specificity of defensin gene expression reveals Paneth cell heterogeneity in mouse small intestine. *Am J Physiol* 271:G68-G74, 1996
27. Diamond G, Bevins CL: beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol* 88:221-225, 1998
28. Diamond G, Jones DE, Bevins CL: Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4596-4600, 1993
29. Diamond G, Russell JP, Bevins CL: Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5156-5160, 1996
30. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL: Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3952-3956, 1991
31. Edman P: Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem Scand* 4:283-293, 1950
32. Ehrlich P, Lazarus A: *Histology of the Blood*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1900
33. Eisenhauer PB, Harwig SS, Lehrer RI: Cryptdins: antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect Immun* 60:3556-3565, 1992
34. Eisenhauer PB, Lehrer RI: Mouse neutrophils lack defensins. *Infect Immun* 60:3446-3447, 1992
35. Elmes ME: The Paneth cell population of the small intestine of the rat-effects of fasting and zinc deficiency on total count and on dithizone-reactive count. *J Pathol* 118:183-191, 1976
36. Evans EW, Beach GG, Wunderlich J, Harmon BG: Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *J Leukoc Biol* 56:661-665, 1994
37. Fant F, Vranken W, Broekaert W, Borremans F: Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ¹H NMR. *J Mol Biol* 279:257-270, 1998

38. Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13, 1983
39. Gallagher DS, Jr., Ryan AM, Diamond G, Bevins CL, Womack JE: Somatic cell mapping of beta-defensin genes to cattle syntenic group U25 and fluorescence in situ localization to chromosome 27. *Mamm Genome* 6:554-556, 1995
40. Ganz T, Lehrer RI: Defensins. *Pharmacol Ther* 66:191-205, 1995
41. Ganz T, Lehrer RI: Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 10:41-44, 1998
42. Ganz T, Rayner JR, Valore EV, Tumolo A, Talmadge K, Fuller F: The structure of the rabbit macrophage defensin genes and their organ-specific expression. *J Immunol* 143:1358-1365, 1989
43. Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI: Defensins. *Eur J Haematol* 44:1-8, 1990
44. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI: Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76:1427-1435, 1985
45. Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P: Plant defense peptides. *Biopolymers* 47:479-491, 1998
46. Gera JF, Lichtenstein A: Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. *Cell Immunol* 138:108-120, 1991
47. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM: Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88:553-560, 1997
48. Gropp R, Frye M, Wagner TO, Bargon J: Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 10:957-964, 1999
49. Hancock RE, Lehrer R: Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 16:82-88, 1998
50. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM: A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861, 1997
51. Harder J, Siebert R, Zhang Y, Matthiesen P, Christophers E, Schlegelberger B, Schroder JM: Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* 46:472-475, 1997
52. Harwig SS, Park AS, Lehrer RI: Characterization of defensin precursors in mature human neutrophils. *Blood* 79:1532-1537, 1992
53. Harwig SS, Swiderek KM, Kokryakov VN, Tan L, Lee TD, Panyutich EA, Aleshina GM, Shamova OV, Lehrer RI: Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes. *FEBS Lett* 342:281-285, 1994
54. Hayashi J, Kawarada Y, Isaji S, Yokoi H, Higashiguchi T: Therapeutic effects of continuous intraarterial antibiotic infusion in preventing pancreatic infection in acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 13:184-192, 1996
55. Haynes RJ, Tighe PJ, Dua HS: Innate defence of the eye by antimicrobial defensin peptides. *Lancet* 352:451-452, 1998
56. Heine G, Raida M, Forssmann WG: Mapping of peptides and protein fragments in human urine using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 776:117-124, 1997
57. Hetru C, Bulet P: Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods Mol Biol* 78:35-49, 1997
58. Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ: A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem* 256:7990-7997, 1981

59. Hiemstra PS, Van Wetering S, Stolk J: Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 12:1200-1208, 1998
60. Huttner KM, Kozak CA, Bevins CL: The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human beta-defensin 1. *FEBS Lett* 413:45-49, 1997
61. Huttner KM, Lambeth MR, Burkin HR, Burkin DJ, Broad TE: Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes. *Gene* 206:85-91, 1998
62. Huttner KM, Ouellette AJ: A family of defensin-like genes codes for diverse cysteine-rich peptides in mouse Paneth cells. *Genomics* 24:99-109, 1994
63. Huttner KM, Selsted ME, Ouellette AJ: Structure and diversity of the murine cryptdin gene family [published erratum appears in *Genomics* 1995 Feb 10;25(3):762]. *Genomics* 19:448-453, 1994
64. Ihi T, Nakazato M, Mukae H, Matsukura S: Elevated concentrations of human neutrophil peptides in plasma, blood, and body fluids from patients with infections. *Clin Infect Dis* 25:1134-1140, 1997
65. Iwanaga S, Kawabata S: Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front Biosci* 3:D973-D984, 1998
66. Iwanaga S, Muta T, Shigenaga T, Miura Y, Seki N, Saito T, Kawabata S: Role of hemocyte-derived granular components in invertebrate defense. *Ann N Y Acad Sci* 712:102-116, 1994
67. Iwanaga S, Muta T, Shigenaga T, Seki N, Kawano K, Katsu T, Kawabata S: Structure-function relationships of tachyplesins and their analogues. *Ciba Found Symp* 186:160-74; discussion 174-5, 1994
68. Jones DE, Bevins CL: Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267:23216-23225, 1992
69. Jones DE, Bevins CL: Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* 315:187-192, 1993
70. Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI: Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:210-214, 1990
71. Kanthack AA, Hardy WB: The morphology and distribution of wandering cells of mammalia. *J Physiol (Lond)* 17:811895
72. Kaplan SS, Heine RP, Simmons RL: Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection. *Infect Immun* 67:1640-1645, 1999
73. Karem K, Foster JW: The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 10:75-86, 1993
74. Kawabata S, Iwanaga S: Big defensin and tachylectins-1 and -2. *Methods Mol Biol* 78:51-61, 1997
75. Klodt J, Kuhn M, Marx UC, Martin S, Rosch P, Forssmann WG, Adermann K: Synthesis, biological activity and isomerism of guanylate cyclase C-activating peptides guanylin and uroguanylin. *J Pept Res* 50:222-230, 1997
76. Lehrer RI: Questions and answers about defensins [editorial]. *Clin Infect Dis* 25:1141-1142, 1997
77. Lehrer RI, Ganz T: Defensins: endogenous antibiotic peptides from human leukocytes. *Ciba Found Symp* 171:276-90; discussion 290-3, 1992
78. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T: Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11:105-128, 1993

79. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P: Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* 137:167-173, 1991
80. Lencer WI, Cheung G, Strohmeier GR, Currie MG, Ouellette AJ, Selsted ME, Madara JL: Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8585-8589, 1997
81. Levy O, Ooi CE, Elsbach P, Doerfler ME, Lehrer RI, Weiss J: Antibacterial proteins of granulocytes differ in interaction with endotoxin. Comparison of bactericidal/permeability-increasing protein, p15s, and defensins. *J Immunol* 154:5403-5410, 1995
82. Lillard JW, Jr., Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR: Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:651-656, 1999
83. Linzmeier R, Michaelson D, Liu L, Ganz T: The structure of neutrophil defensin genes [published erratum appears in *FEBS Lett* 1993 Jul 12;326(1-3):299-300]. *FEBS Lett* 321:267-273, 1993
84. Liu L, Ganz T: The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting. *Blood* 85:1095-1103, 1995
85. Liu L, Wang L, Jia HP, Zhao C, Heng HHQ, Schutte BC, McCray PB, Jr., Ganz T: Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 222:237-244, 1998
86. MacLeod RJ, Hamilton JR, Bateman A, Belcourt D, Hu J, Bennett HP, Solomon S: Corticostatic peptides cause nifedipine-sensitive volume reduction in jejunal villus enterocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:552-556, 1991
87. McCray PB, Jr., Bentley L: Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:343-349, 1997
88. Metchnikov E: *Immunity in Infective Disease*. Cambridge University Press, London, pp 198, 1905
89. Miller SI, Pulkkinen WS, Selsted ME, Mekalanos JJ: Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 58:3706-3710, 1990
90. Miyasaki KT, Bodeau AL, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI: In vitro sensitivity of oral, gram-negative, facultative bacteria to the bactericidal activity of human neutrophil defensins. *Infect Immun* 58:3934-3940, 1990
91. Nagaoka I, Yomogida S, Nakamura S, Someya A, Iwabuchi K, Yamashita T: Evaluation of the expression of the cationic peptide gene in various types of leukocytes. *FEBS Lett* 302:279-283, 1992
92. Nakazato M, Shiomi K, Date Y, Matsukura S, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H: Isolation and sequence determination of 6- and 8-kDa precursors of human neutrophil peptides from bone marrow, plasma and peripheral blood neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 211:1053-1062, 1995
93. Ottaway CA, Greenberg GR: Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and the modulation of mitogen responses. *J Immunol* 132:417-423, 1984
94. Ouellette AJ: Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment. *Gastroenterology* 113:1779-1784, 1997
95. Ouellette AJ, Hsieh MM, Nosek MT, Cano-Gauci DF, Huttner KM, Buick RN, Selsted ME: Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect Immun* 62:5040-5047, 1994
96. Ouellette AJ, Miller SI, Henschen AH, Selsted ME: Purification and primary structure of murine cryptdin-1, a Paneth cell defensin. *FEBS Lett* 304:146-148, 1992
97. Ouellette AJ, Pravtcheva D, Ruddle FH, James M: Localization of the cryptdin locus on mouse chromosome 8 [published erratum appears in *Genomics* 1992 Mar;12(3):626]. *Genomics* 5:233-239, 1989

98. Panyutich A, Ganz T: Activated alpha 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:101-106, 1991
99. Panyutich AV, Hiemstra PS, Van Wetering S, Ganz T: Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:351-357, 1995
100. Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Baturevich EA, Ganz T: Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med* 122:202-207, 1993
101. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ: Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol* 131:1613-1615, 1983
102. Pereira HA, Erdem I, Pohl J, Spitznagel JK: Synthetic bactericidal peptide based on CAP37: a 37-kDa human neutrophil granule-associated cationic antimicrobial protein chemotactic for monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4733-4737, 1993
103. Pereira HA, Spitznagel JK, Pohl J, Wilson DE, Morgan J, Palings I, Larrick JW: CAP 37, a 37 kD human neutrophil granule cationic protein shares homology with inflammatory proteinases. *Life Sci* 46:189-196, 1990
104. Peterson CGB, Jörnvall H, Venge P: Purification and characterization of eosinophil cationic protein from human eosinophils. *Eur J Haematol* 40:415-423, 1988
105. Peterson CGB, Venge P: Purification and characterization of a new cationic protein -eosinophil protein X (EPX) - from granulocytes of human eosinophils. *Immunology* 50:19-26, 1983
106. Peterson MW, Walter ME, Nygaard SD: Effect of neutrophil mediators on epithelial permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:719-727, 1995
107. Petterson A: Ueber die bakteriziden leukocytenstoffe und ihre Beziehung zur Immunität. *Centr Bakteriolog Parasitenk Abt I* 39:423-437, 1905
108. Piers KL, Brown MH, Hancock RE: Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2311-2316, 1994
109. Pierzynowski SG, Sharma P, Sobczyk J, Garwacki S, Barej W, Westrom B: Comparative study of antibacterial activity of pancreatic juice in six mammalian species. *Pancreas* 8:546-550, 1993
110. Porter EM, Liu L, Oren A, Anton PA, Ganz T: Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infect Immun* 65:2389-2395, 1997
111. Porter EM, Poles MA, Lee JS, Naitoh J, Bevins CL, Ganz T: Isolation of human intestinal defensins from ileal neobladder urine. *FEBS Lett* 434:272-276, 1998
112. Porter EM, van Dam E, Valore EV, Ganz T: Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect Immun* 65:2396-2401, 1997
113. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC: Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 152:1247-1258, 1998
114. Ritonja A, Kopitar M, Jerala R, Turk V: Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes. *FEBS Lett* 255:211-214, 1989
115. Ryan LK, Rhodes J, Bhat M, Diamond G: Expression of beta-defensin genes in bovine alveolar macrophages. *Infect Immun* 66:878-881, 1998
116. Sahl HG, Brandis H: Grundzüge der Physiologie der Bakterien, Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Edited by Brandis H, Pulverer G. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp 27-37, 1988

117. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988
118. Salzman NH, Polin RA, Harris MC, Ruchelli E, Hebra A, Zirin-Butler S, Jawad A, Martin Porter E, Bevins CL: Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 44:20-26, 1998
119. Sands BE, Podolsky DK: The Trefoil Peptide Family. *Annu Rev Physiol* 58:253-273, 1996
120. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467, 1977
121. Sawicki W, Mystkowska ET: Contraceptive potential of peptide antibiotics. *Lancet* 353:464-465, 1999
122. Schägger H, von Jagow G: Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379, 1987
123. Schnapp D, Harris A: Antibacterial peptides in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:352-356, 1998
124. Schnapp D, Reid CJ, Harris A: Localization of expression of human beta defensin-1 in the pancreas and kidney. *J Pathol* 186:99-103, 1998
125. Schönwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA: Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267:1645-1648, 1995
126. Schulz-Knappe P, Raida M, Meyer M, Quellhorst EA, Forssmann WG: Systematic isolation of circulating human peptides: the concept of peptide trapping. *Eur J Med Res* 1:223-236, 1996
127. Schulz-Knappe P, Schrader M, Standker L, Richter R, Hess R, Jurgens M, Forssmann WG: Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J Chromatogr A* 776:125-132, 1997
128. Scocchi M, Romeo D, Cinco M: Antimicrobial activity of two bactenecins against spirochetes. *Infect Immun* 61:3081-3083, 1993
129. Scocchi M, Romeo D, Zanetti M: Molecular cloning of Bac7, a proline- and arginine-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. *FEBS Lett* 352:197-200, 1994
130. Sebastiano PD, Fink T, di Mola FF, Weihe E, Innocenti P, Friess H, Büchler MW: Pathology of neuroimmune appendicitis. *Lancet* 354:461-466, 1999
131. Segura A, Moreno M, Madueno F, Molina A, Garcia-Olmedo F: Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 12:16-23, 1999
132. Segura A, Moreno M, Molina A, Garcia-Olmedo F: Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett* 435:159-162, 1998
133. Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, Lehrer RI: Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J Biol Chem* 258:14485-14489, 1983
134. Selsted ME, Harwig SS: Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *J Biol Chem* 264:4003-4007, 1989
135. Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI: Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 76:1436-1439, 1985
136. Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ: Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol* 118:929-936, 1992

137. Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, McGuire PA, Novotny MJ, Smith W, Henschen AH, Cullor JS: Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta- defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 268:6641-6648, 1993
138. Shafer WM: *Methods in molecular biology*; 78. *Antibacterial Peptide Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997,
139. Shafer WM, Martin LE, Spitznagel JK: Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate. *Infect Immun* 45:29-35, 1984
140. Shimoda M, Ohki K, Kohashi O: [Defensins, antimicrobial peptides, and their mechanism of actions]. *Nippon Saikingaku Zasshi* 50:471-480, 1995
141. Singh A, Bateman A, Zhu QZ, Shimasaki S, Esch F, Solomon S: Structure of a novel human granulocyte peptide with anti-ACTH activity. *Biochem Biophys Res Commun* 155:524-529, 1988
142. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB, Jr.: Production of beta-defensins by human airway epithelia [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Mar 2; 96(5):2569]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14961-14966, 1998
143. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:674-679, 1986
144. Soong LB, Ganz T, Ellison A, Caughey GH: Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm Res* 46:98-102, 1997
145. Sparkes RS, Kronenberg M, Heinzmann C, Daher KA, Klisak I, Ganz T, Mohandas T: Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23. *Genomics* 5:240-244, 1989
146. Spitznagel JK: Antibiotic proteins of human neutrophils. *J Clin Invest* 86:1381-1386, 1990
147. Spitznagel JK, Chi HY: Cationic proteins and antibacterial properties of infected tissues and leukocytes. *Am J Pathol* 43:697-711, 1963
148. Steer ML, Waxman I, Freedman S: Chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 332:1482-1490, 1995
149. Steinberg W, Tenner S: Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 330:1198-1210, 1994
150. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG: Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292:246-248, 1981
151. Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M: Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8686-8690, 1997
152. Storici P, Zanetti M: A cDNA derived from pig bone marrow cells predicts a sequence identical to the intestinal antibacterial peptide PR-39. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1058-1065, 1993
153. Tang YQ, Selsted ME: Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 268:6649-6653, 1993
154. Tarver AP, Clark DP, Diamond G, Russell JP, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cohen KS, Jones DE, Sweeney RW, Wines M, Hwang S, Bevins CL: Enteric beta-defensin: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection [published erratum appears in *Infect Immun* 1998 May;66(5):2399]. *Infect Immun* 66:1045-1056, 1998
155. Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R: Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* 84:2017-2020, 1989

156. Thim L: A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett* 250:85-90, 1989
157. Thomas PS: Hybridization of denatured RNA transferred or dotted nitrocellulose paper. *Methods Enzymol* 100:255-266, 1983
158. Valore EV, Ganz T: Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 79:1538-1544, 1992
159. Valore EV, Martin E, Harwig SS, Ganz T: Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its propeptide. *J Clin Invest* 97:1624-1629, 1996
160. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Jr., Ganz T: Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633-1642, 1998
161. van den Berg RH, Faber-Krol MC, Van Wetering S, Hiemstra PS, Daha MR: Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood* 92:3898-3903, 1998
162. von Heijne G: A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 14:4683-4690, 1986
163. Weiss J, Elsbach P, Olsson I, Odeberg H: Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 253:2664-2672, 1978
164. Wicht H, Maronde E, Olcese J, Korf HW: A semiquantitative image-analytical method for the recording of dose-response curves in immunocytochemical preparations. *J Histochem Cytochem* 47:411-420, 1999
165. Wilde CG, Griffith JE, Marra MN, Snable JL, Scott RW: Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem* 264:11200-11203, 1989
166. Wimley WC, Selsted ME, White SH: Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* 3:1362-1373, 1994
167. Yount NY, Yuan J, Tarver A, Castro T, Diamond G, Tran PA, Levy JN, McCullough C, Cullor JS, Bevins CL, Selsted ME: Cloning and expression of bovine neutrophil beta-defensins. Biosynthetic profile during neutrophilic maturation and localization of mature peptide to novel cytoplasmic dense granules. *J Biol Chem* 274:26249-26258, 1999
168. Zasloff M: Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5449-5453, 1987
169. Zeya HI, Spitznagel JK: Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: separation and identification. *Science* 142:1085-1087, 1963
170. Zeya HI, Spitznagel JK: Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes: resolution of antibacterial and enzymatic activities. *J Bact* 91:750-754, 1966
171. Zeya HI, Spitznagel JK: Antimicrobial specificity of leukocyte lysosomal cationic proteins. *Science* 154:1049-1051, 1966
172. Zeya HI, Spitznagel JK: Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action. *J Bacteriol* 91:755-762, 1966
173. Zeya HI, Spitznagel JK: Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. I. Resolution of antibacterial and enzymatic activities. *J Bacteriol* 91:750-754, 1966

174. Zeya HI, Spitznagel JK: Arginine-rich proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. Antimicrobial specificity and biochemical heterogeneity. *J Exp Med* 127:927-941, 1968
175. Zeya HI, Spitznagel JK: Cationic protein-bearing granules of polymorphonuclear leukocytes: separation from enzyme-rich granules. *Science* 163:1069-1071, 1969
176. Zhao C, Wang I, Lehrer RI: Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 396:319-322, 1996
177. Zimmermann GR, Legault P, Selsted ME, Pardi A: 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, 1995
178. Zucht HD, Grabowsky J, Schrader M, Liepke C, Jurgens M, Schulz-Knappe P, Forssmann WG: Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur J Med Res* 3:315-323, 1998

Anlagen

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Weiterhin versichere ich, dass die durchgeführte Arbeit nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Jörg Grabowsky

Hannover, den 28.09.1999

Anlagen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jörg Grabowsky
Geburtsdatum: 03.02.1962
Geburtsort: 2300 Kiel
Familienstand: ledig
Wohnort: Sibeliusweg 16
D-30655 Hannover
Telefon: +49 511 6478055
+49 178 5550302
E-Mail: J.Grabowsky@gmx.de



Schulischer und beruflicher Werdegang

1962-1978 Grundschule und Realschule in 2357 Bad Bramstedt

1978-1981 Berufsausbildung zum Industriekaufmann und kaufmännischer Angestellter
bei Hentschke & Sawatzki, Chemische Fabrik GmbH, 2350 Neumünster

1982-1987 Soldat auf Zeit bei der Bundeswehr in 2350 Neumünster
Ausbildung zum Unteroffizier und zum Fernmeldestabsoffizier

1987-1988 Angestellter bei der Schleswig-Holsteinischen Landschaft (Realkreditinstitut)
in 2300 Kiel

1987-1988 Autodidaktische Weiterbildung auf den Gebieten Biochemie, Gentechnologie
und Sozialpädagogik

13.06.1988 Erwerb der Berechtigung zum Studium des Faches Biochemie
beim Niedersächsischen Prüfungsamt in 3000 Hannover

21.06.1988 Erwerb der Fachhochschulreife im Fachbereich Sozialpädagogik
bei der Behörde für Schule und Berufsbildung in 2000 Hamburg

Anlagen

Akademischer Werdegang

- 10/1988-03/1990 Studium der Chemie an der Universität Gesamthochschule Paderborn.
- 04/1990-11/1993 Studium der Biochemie an der Universität Hannover.
Diplomprüfung im Fachbereich Chemie der Universität Hannover in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Zoophysiologie.
- 12/1993-07/1994 Diplomarbeit am Zentrum Innere Medizin und Dermatologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie bei Prof. Dr. M.P. Manns, Dr. S.C. Bischoff, PD Dr. V. Kaever.
Schwerpunkt: Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von fäkalen Entzündungsmediatoren bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.
- 27.07.1994 Verleihung des Hochschulgrades „Diplom-Biochemiker“.
- 10/1992-04/1995 Studentische Hilfskraft im Bereitschaftslabor des Instituts für Klinische Chemie I der Medizinischen Hochschule Hannover.
- 08/1994-04/1997 Wissenschaftliche Hilfskraft am Zentrum Innere Medizin und Dermatologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie bei Prof. Dr. M.P. Manns, Dr. S.C. Bischoff.
Schwerpunkt: Methodenentwicklung und Durchführung klinischer Studien zur Korrelation von Metaboliten entzündlicher Reaktionen mit dem Krankheitsbild bei Menschen mit gastroenterologischen Erkrankungen und darmgesunden Personen.
- 05/1997-11/1999 Wissenschaftlicher Angestellter und Erstellung einer Dissertation am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung GmbH (IPF), Hannover bei Prof. Dr. Dr.h.c. W.-G. Forssmann.
Schwerpunkt: Funktionelle Charakterisierung eines humanen endogenen Peptidantibiotikums mit Homologie zu bovinen β -Defensinen.
DFG-Projekt BE 1799/1-1.
- 02.11.1999 Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften, Dr. rer. nat., durch den Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

Veröffentlichungen

Bischoff S.C., Grabowsky J., Manns M.P. Quantification of Inflammatory Mediators in Stool Samples of Patients with Inflammatory Bowel Disorders and Controls. Dig Dis Sci 42 (2): 394-403 (1997).

J. Grabowsky, H.D. Zucht, M. Schrader, C. Liepke, M. Jürgens, P. Schulz-Knappe, W.G. Forssmann. Human- β -defensin-1: A Urinary Peptide Present in Variant Molecular Forms and Its Putative Functional Implication. Eur J Med Res 3 (7): 315-323 (1998).