

**Untersuchungen zur Rolle intrazellulärer
Rezeptoren bei der Induktion von
antimikrobiellen Peptiden durch
Pathogen assoziierte Moleküle (PAMs)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

Eske Voß

Kiel 2006

Referent/in: Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit

Korreferent/in: PD Dr. Jürgen Harder

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Februar 2007

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 07. Februar 2007

Der Dekan

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die physikalische und chemische Barriere der Haut.....	1
1.2 Pathogen assoziierte Moleküle (PAMs)	3
1.3 Rezeptoren zur Erkennung von PAMs	3
1.3.1 Extrazelluläre Rezeptoren	4
1.3.2 Intrazelluläre Rezeptoren.....	4
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit	8
2. MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1 Chemikalien und Reagenzien	9
2.1.1 Chemikalien	9
2.1.2 Oligonukleotide	10
2.1.3 Enzyme.....	12
2.1.4 Mikroorganismen	12
2.1.4.1 Kultivierung von <i>Salmonella typhimurium</i>	12
2.1.4.2 Herstellung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturüberständen	12
2.2 Kultivierung humaner eukaryotischer Zelllinien	13
2.2.1 CaCo-2-Zelllinie	13
2.2.2 HEK293-Zelllinie	13
2.2.3 MKN-45-Zelllinie	14
2.2.4 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten	14
2.2.5 Kollagenbeschichtung von Kulturflaschen und Kulturplatten	14
2.2.6 Subkultivierung humaner eukaryotischer Zelllinien.....	15
2.3 Molekularbiologische Methoden	15
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	15
2.3.2 Zur Verfügung gestellte Promotor-Vektor-Konstrukte	16
2.3.3 Herstellung der NOD2-Überexpressionsplasmide	17
2.3.3.1 Amplifikation der vollständigen NOD2-cDNA aus genomischer DNA...17	
2.3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	18

2.3.3.3	Ligation von Vektor und Promotorfragmenten.....	18
2.3.3.4	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen.....	19
2.3.3.5	Transformation.....	19
2.3.3.6	PCR zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR) ..	20
2.3.3.7	DNA-Sequenzierung.....	21
2.3.3.8	PCR zur Generierung mutierter Expressionsplasmide.....	21
2.3.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	22
2.3.4.1	Transfektion mit Fugene 6 und ProteoJuice.....	22
2.3.4.2	„Knock-down“-Experimente an primären humanen Keratinozyten mit „Stealth“-siRNA.....	24
2.3.5	Stimulation der Zellen.....	25
2.4	Proteinanalytik.....	26
2.4.1	Aufschluss eukaryotischer Zellen.....	26
2.4.2	Proteinbestimmung.....	26
2.4.3	Gelelektrophorese und Westernblot.....	26
2.4.3.1	Gelelektrophorese.....	26
2.4.3.2	Westernblot.....	27
2.4.4	HBD-2-ELISA.....	27
2.4.5	Immunhistochemische Färbung.....	28
2.4.6	Luziferase-Assay.....	29
2.5	Genexpression in Epithelzellen.....	30
2.5.1	Semiquantitative RT-PCR.....	30
2.5.1.1	RNA-Isolierung.....	30
2.5.1.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	31
2.5.1.3	Reverse Transkription (RT) von RNA (cDNA-Synthese).....	31
2.5.1.4	„Realtime“-Polymerase-Kettenreaktion.....	31
2.6	Darstellung der Ergebnisse.....	33
3.	ERGEBNISSE.....	34
3.1	Überexpressionsstudien mit NOD2 im HEK293-Modell.....	34
3.1.1	MDP aktiviert den hBD-2-Promotor über NOD2.....	36

3.1.2	Eine MDP-Konzentrationssteigerung resultiert in einer Verstärkung der hBD-2-Promotoraktivierung über NOD2	37
3.1.3	Die hBD-2-Promotoraktivierung ist unabhängig von der Konzentration des NOD2-Expressionsvektors.....	38
3.1.4	Einfluss der NF- κ B-Regulation bei der NOD2-vermittelten hBD-2-Induktion	39
3.1.5	Hemmung der NOD2-vermittelten hBD-2-Induktion.....	41
3.1.5.1	Die Mutante von I κ B hemmt die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion....	41
3.1.5.2	Helenalin reduziert die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion	42
3.2	NOD2-Expression in verschiedenen Geweben	43
3.2.1	NOD2-mRNA wird in verschiedenen Geweben exprimiert	43
3.2.2	<i>In vivo</i> Expression von NOD2 in der Haut	44
3.3	Expression von NOD2 in primären Keratinozyten	46
3.3.1	NOD2-Proteinexpression	46
3.3.2	MDP-induzierte hBD-2-Proteinexpression	47
3.3.3	Induktion der NOD2-Expression durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen.....	47
3.3.4	Die Stimulation der hBD-2-mRNA-Expression in Keratinozyten durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturüberstände wird nicht über NOD2 vermittelt	48
3.3.5	„Knock-Down“-Experimente an humanen primären Keratinozyten mit „Stealth“-siRNA.....	50
3.3.5.1	GL3-siRNA inhibiert die NOD2-Expression.....	50
3.3.5.2	Hemmung der NOD2-Genexpression mit NOD2-spezifischer siRNA ..	51
3.4	Die Stimulation mit <i>Salmonella typhimurium</i> induziert nicht die NOD2-vermittelte hBD-2-mRNA-Expression in CaCo-2- oder MKN-45-Zellen	53
3.5	Expression von verschiedenen NLR-Proteinen in primären Keratinozyten	57
4.	DISKUSSION.....	60
4.1	Untersuchungen am HEK293-Modell	61

4.2	NOD-Expression in verschiedenen Geweben	66
4.3	NOD2-Expression in Keratinozyten.....	67
4.3.1	NOD2-Proteinexpression	67
4.3.2	Hemmung der NOD2-Genexpression durch NOD2-siRNA.....	68
4.3.3	NOD2-mRNA-Expression durch Stimulation mit Zytokinen	69
4.3.4	HBD-2-mRNA-Expression in Keratinozyten durch Stimulation mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Überständen	70
4.4	Bedeutung von NOD-Rezeptoren für die Unterscheidung von pathogenen und nicht-pathogenen Bakterien	72
4.5	NOD2-vermittelte hBD-2-mRNA-Expression in CaCo-2- und MKN-45- Zellen durch Stimulation mit <i>Salmonella typhimurium</i>	73
4.6	Expression von anderen NLR-Proteine in primären Keratinozyten	74
4.7	Ausblick.....	75
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	SUMMARY	80
7.	LITERATURVERZEICHNIS	82
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	92
	DANKSAGUNG	95
	LEBENS LAUF	96
	ERKLÄRUNG.....	97

1. Einleitung

1.1 Die physikalische und chemische Barriere der Haut

Die menschliche Haut ist im permanenten Kontakt mit einer großen Anzahl unterschiedlicher auch potentiell pathogener Mikroorganismen wie Pilzen, Viren und Bakterien (10^2 bis 10^7 Mikroorganismen/cm² Haut). Umso erstaunlicher ist es, dass Hautinfektionen bei gesunden Menschen selten vorkommen (Fitzpatrick et al. 1993). Die Haut schützt sich durch eine intakte physikalische Barriere vor Pathogenbefall. Zu diesem Schutzmechanismus zählt die regelmäßige Erneuerung der Oberflächen von Haut und Schleimhaut, die Schleimabsonderung der Mucosa von Schleimhäuten, der relativ niedrige pH-Wert (sogenannter „Säureschutzmantel“) sowie eine Lipidbarriere aus langkettigen Fettsäuren, wodurch das Adhären und Eindringen von Mikroorganismen erschwert wird.

Neben der physikalischen Barriere besitzen Wirbeltiere ein hocheffizientes System zur Abwehr von Infektionen, das auf dem Zusammenspiel von humoralen und zellulären Mechanismen des adaptiven und angeborenen Immunsystems zurückzuführen ist. Beispiele hierfür sind neutrophile Granulozyten zur Abwehr von Bakterien und Pilzen, eosinophile Granulozyten zur Abwehr von Parasiten, natürliche Killerzellen zur Eliminierung virusinfizierter Zellen des Körpers, Makrophagen für die Beseitigung von Mikroorganismen und apoptotischen Zellen sowie B- und T-Lymphozyten. Die Abwehr wird durch humorale Faktoren wie die Lektine, das Komplementsystem und erregerspezifische Antikörper beschleunigt (Janeway und Medzhitov 2002). Da die oben aufgeführten Effektorzellen überwiegend im Blut zirkulieren und erst durch Botenstoffe (z. B. Zytokine, Chemokine) aktiviert in die betroffenen Epithelien eindringen, können sie für die natürliche Resistenz der Epithelien gegen ständig drohende bakterielle Infektionen primär nicht verantwortlich sein.

Boman beschrieb 2000, dass Epithelien wie die menschliche Haut neben ihren Funktionen als physikalische Barrieren und den beschriebenen zellulären Abwehrmaßnahmen auch eine „chemische Barriere“ als Abwehrsystem besitzen, die

zur Erhaltung der natürlichen Integrität beiträgt (Boman 2000). Dieses chemische Abwehrsystem basiert auf der Produktion verschiedener antimikrobieller Proteine (AMP) (Ganz und Lehrer 1998; Schröder 1999a; Zasloff 2002; Boman 2003). AMP kommen sowohl in Wirbellosen als auch in Wirbeltieren vor und wurden entsprechend ausgiebig charakterisiert. Neben konstitutiv exprimierten AMP, deren Expression unabhängig von äußeren Einflüssen konstant ist, gibt es induzierbare AMP, deren Expression durch äußere Stimuli beeinflusst werden kann.

Als erstes induzierbares AMP des Menschen wurde das humane β -Defensin-2 (hBD-2) beschrieben. HBD-2 wurde ursprünglich aus läsionaler psoriatischer Haut isoliert (Harder et al. 1997), da Patienten mit Psoriasis seltener Hautinfektionen aufweisen, als aufgrund der epidermalen Hyperproliferation zu erwarten wäre. HBD-2 gehört zur Familie der β -Defensine, einer Gruppe von kleinen (4-5 kDa) kationischen antibiotischen Peptiden mit einem breiten antimikrobiellen Wirkungsspektrum (Ganz 2003). Erstmals wurde dieses AMP in Rindern entdeckt (Diamond et al. 1991). Die Fähigkeit von hBD-2, Bakterien *in vivo* abzutöten, wurde in einer Gentherapie-Studie mit Mäusen demonstriert, die hBD-2-exprimierende Tumorzellen tragen. Nach einer Infektion mit *Escherichia coli* konnten hier in Mäusen mit hBD-2-produzierenden Tumorzellen weniger überlebensfähige Bakterien nachgewiesen werden als in den Kontrollansätzen (Huang et al. 2002). Neben der Funktion, als antimikrobielles Peptid wirksam zu sein, kann hBD-2 die adaptive Immunantwort durch die Rekrutierung von dendritischen Zellen und T-Zellen an den Ort der mikrobiellen Invasion fördern. Dies erfolgt durch Interaktionen mit dem Chemokinrezeptor CCR6 („chemokine (C-C motif) receptor 6“) (Yang et al. 1999). HBD-2 stellt darüber hinaus auch ein spezifisches „Chemoattractant“ für mit Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)-behandelte humane neutrophile Granulozyten dar (Niyonsaba et al. 2004). HBD-2 wird in zahlreichen Epithelien wie Haut, Atemwege, Verdauungstrakt und Urogenitaltrakt exprimiert. Neben mikrobiellen Stimulantien (Harder et al. 1997; Wada et al. 1999; Harder et al. 2000; O'Neil et al. 2000; Krisanaprakornkit et al. 2002; Tsutsumi-Ishii und Nagaoka 2002; Chung und Dale 2004; Harder et al. 2004; Proud et al. 2004; Wehkamp et al. 2004a; Sorensen et al. 2005) kann die Expression von hBD-2 auch durch Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) (Mathews et al. 1999; Liu et al. 2003; McDermott et al. 2003; Tsutsumi-Ishii und Nagaoka 2003; Harder et al. 2004), TNF- α

(Harder et al. 1997; Harder et al. 2000; Lehmann et al. 2002; McDermott et al. 2003; Nomura et al. 2003), IL-22 (Wolk et al. 2004) und IL-17 (Kao et al. 2004) induziert werden.

1.2 Pathogen assoziierte Moleküle (PAMs)

Pathogene Mikroorganismen werden vom angeborenen Immunsystem durch spezifische Substanzen erkannt, die als Pathogen assoziierte Moleküle (PAMs) bezeichnet werden. Diese PAMs werden von bestimmten Mikroorganismen, nicht aber vom mehrzelligen Wirt produziert (Akira et al. 2006). Solche PAMs sind beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), die von Gram-negativen Bakterien gebildet werden. Gram-positive Bakterien produzieren Lipoteichonsäuren, Lipoproteine und Lipoarabinomannan. Peptidoglykan ist ein PAM der Zellwand sowohl von Gram-positiven als auch von Gram-negativen Bakterien. Begeißelte Bakterien produzieren Flagellin, das auch ein PAM darstellt. Doppel- und einzelsträngige RNA (dsRNA, ssRNA) sind PAMs, die von Viren abstammen. Pilze wiederum bilden die PAMs Chitin und β -Glukane. PAMs sind essentiell für das Überleben von Mikroorganismen und können daher nicht ohne weiteres verändert oder ersetzt werden. Deshalb können sich die Mikroorganismen auch nicht der Erkennung ihrer PAMs durch z. B. spezifische Rezeptoren höherer Organismen entziehen. Humane Keratinozyten besitzen die Fähigkeit, Mikroorganismen und deren Pathogen assoziierte Produkte zu erkennen (Harder et al. 1997; Schröder 1999b; Harder et al. 2001; Takeda und Akira 2005) und nachfolgend eine Abwehrreaktion durch die Freisetzung von antimikrobiellen Proteinen wie z. B. hBD-2, hBD-3 sowie proinflammatorischen Zytokinen zu initiieren.

1.3 Rezeptoren zur Erkennung von PAMs

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, PAMs über Mustererkennungsrezeptoren ("pattern recognition receptors, PRRs") zu detektieren (Janeway und Medzhitov 2002). Zu diesen Erkennungsrezeptoren gehören die membranständigen „Toll-like“-Rezeptoren (TLR), Mannoserezeptoren, β -Integrine (CD11/CD18),

Scavenger Rezeptoren sowie Mannose-bindene Lectine, die sezerniert werden. Zu den intrazellulären Rezeptoren gehören die „nucleotide-binding oligomerization domain“ (NOD)-like Rezeptoren (NLR), die ebenso wie die TLRs zur Erkennung von PAMs sogenannte „leucine-rich repeats“ (LRRs) besitzen.

1.3.1 Extrazelluläre Rezeptoren

Die Familie der membrangebundenen humanen TLRs spielen eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr. TLRs gehören zur Familie der Typ-I-Transmembranrezeptoren, die eine extrazelluläre LRR-Domäne und eine intrazelluläre Toll/Interleukin 1 (TIR)-Domäne besitzen (Takeda und Akira 2005). Die Familie dieser Typ-I-Transmembranrezeptoren weist Homologien zum *Drosophila melanogaster*-Protein Toll auf. Das in *Drosophila melanogaster* identifizierte Toll-Protein vermittelt nach Aktivierung durch PAMs z. B. die Induktion von AMP, die wiederum in der Lage sind Mikroorganismen abzutöten (Hoffmann 2003). Bis heute wurden 10 humane TLRs identifiziert, die diverse mikrobielle Produkte erkennen (Kaisho und Akira 2006). Beispiele hierfür sind TLR4, der bakterielles LPS in Verbindung mit den Co-Rezeptoren CD14 und MD2 erkennt. Flagellin wird durch TLR5 erkannt. Neue Untersuchungen konnten zeigen, dass TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 10 in primären Keratinozyten exprimiert werden (Lebre et al. 2006).

1.3.2 Intrazelluläre Rezeptoren

Kürzlich wurde die neue Klasse der „NOD-like“-Rezeptoren (NLRs) entdeckt, die ebenfalls eine wichtige Bedeutung für die Erkennung von PAMs zu haben scheint. In Abbildung 1 sind die Mitglieder der NLRs schematisch dargestellt. Die NLRs unterscheiden sich durch ihre N-terminale Effektor-domäne, die entweder eine PYD-, CARD- oder BIR-Domäne ist. Diese Domänen sind für die Signalweiterleitung verantwortlich (Meylan et al. 2006). Zur Zeit sind aus der NLR-Klasse 14 NALP-Proteine, fünf NOD-Proteine, ein IPAF-Protein, ein CIITA-Protein und ein NAIP-Protein bekannt. Alle Mitglieder dieser Klasse besitzen am C-terminalen Ende eine LRR-Domäne, die der Ligandenerkennung dient (Meylan et al. 2006). Die LRR-Regionen dieser intrazellulären Rezeptoren sind an der Erkennung von

Mikroorganismen und intrazellulären pathogenen Komponenten (PAMs) beteiligt (Chamaillard et al. 2003; Tschopp et al. 2003), ähnlich wie bei den homologen LRRs von „plant disease resistance proteins“ (Dangl und Jones 2001) und „Toll-like“-Rezeptoren (Underhill und Ozinsky 2002).

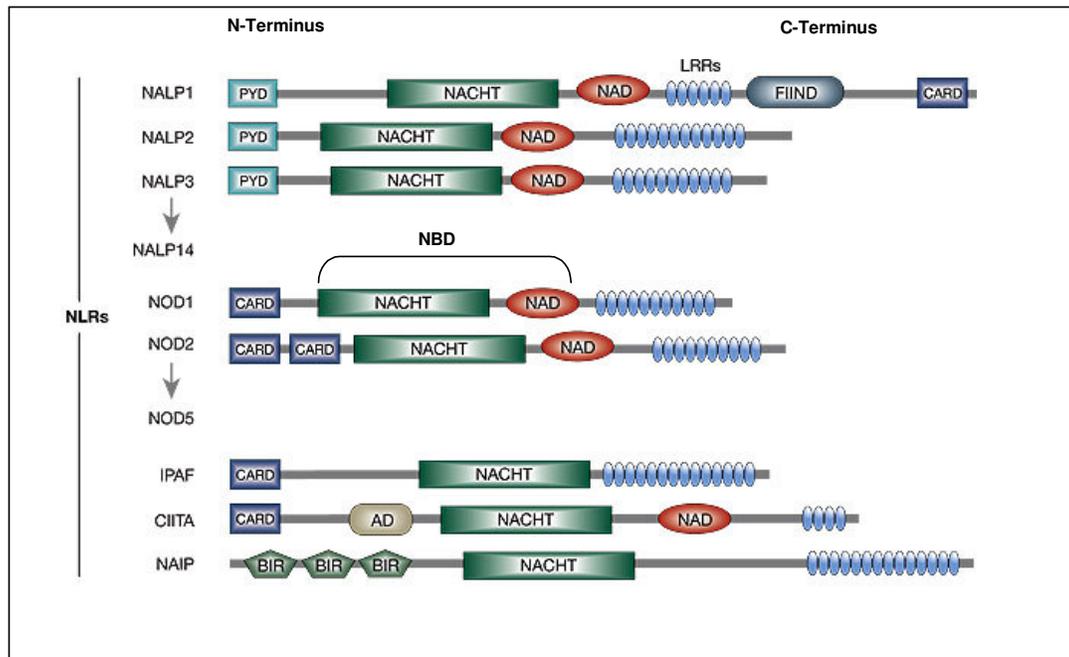


Abb. 1: Übersicht über die Familie der „NOD-like“-Rezeptoren (NLR). AD: activation domain; BIR: Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat; CIITA: major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator; CARD: caspase recruitment domain; IPAF: ICE (Interleukin 1 converting enzyme) protease-activating factor; LRR: leucine-rich repeat; FIIND: function to find; NACHT: Naip, CIITA, HET-E (plant het product involved in vegative incompatibility) and TP-1 (telomerase-associated protein 1); NAD: NACHT-associated domain; NAIP: neuronal apoptosis inhibitory protein; NBD: Nucleotide-binding domain; NALP: NACHT and TP-1, LRR- and PYD-containing proteins; NOD: nucleotide-binding oligomerization domain; PYD: pyrin domain (modifiziert nach Meylan et al, 2006).

Zwei intensiv untersuchte Mitglieder dieser NLR-Familie sind NOD1 (auch CARD4 genannt) und NOD2 (CARD15). Beide Rezeptoren weisen 10 C-terminal lokalisierte LRRs auf, eine intermediäre „nucleotide-binding domain“ (NBD)-Domäne, die die Oligomerisation vermittelt, und eine (NOD1) bzw. zwei (NOD2) N-terminale CARD-Domänen (Ogura et al. 2001b). Es wurde gezeigt, dass NOD1 eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Erkennung von *Shigella flexneri* in infizierten Epithelzellen spielt. Während der Infektion der Epithelzellen mit diesem Gram-negativen invasiven Bakterium aktiviert und vermittelt NOD1 die anschließende Induktion des

proinflammatorischen Signalweges via NF- κ B (Philpott et al. 2000; Girardin et al. 2001). Es wurde entdeckt, dass der putative intrazelluläre Peptidoglykanrezeptor NOD2 in antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Ogura et al. 2001b). Aktuellere Studien zeigen, dass NOD2 vermehrt sowohl in epithelialen Paneth-Zellen des Dünndarms als auch in anderen epithelialen Zellen (Ogura et al. 2001b; Gutierrez et al. 2002; Lala et al. 2003; Ogura et al. 2003; Rosenstiel et al. 2003) exprimiert ist.

NOD1 und NOD2 sind in der Lage, als PRRs bakterielles Peptidoglykan, eine wichtige Komponente der bakteriellen Zellwand, über ihre C-terminalen LRRs zu erkennen (Inohara et al. 2001; Girardin et al. 2003a). Die Zellwände von Bakterien bestehen aus alternierenden N-Acetylglucosaminsäure- (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc)-Einheiten, die β -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind. Untersuchungen haben ergeben, dass NOD1 spezifische Peptidoglykanmoleküle erkennt, die die fast ausschließlich bei Gram-negativen Bakterien vorkommende *meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*-DAP) als Zellwandbaustein beinhalten. Die kleinste synthetisch hergestellte Komponente, die NOD1 aktivieren kann, ist γ -D-Glutamyl-*meso*-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), die in Abbildung 2 schematisch dargestellt ist (Chamaillard et al. 2003; Girardin et al. 2003a; Girardin et al. 2003b).

Von NOD2 wird das Muramyl Dipeptid (MDP), ein Peptidoglykanfragment der Zellwand Gram-negativer wie auch Gram-positiver Bakterien, durch die LRR-Region erkannt (Abbildung 2). Dies führt zu einer proinflammatorischen Antwort durch die Aktivierung von NF- κ B (Girardin et al. 2003a; Girardin et al. 2003b; Inohara et al. 2003). NOD2 kann also als genereller Sensor von Peptidoglykan durch die Erkennung von MDP angesehen werden (Girardin et al. 2003a).

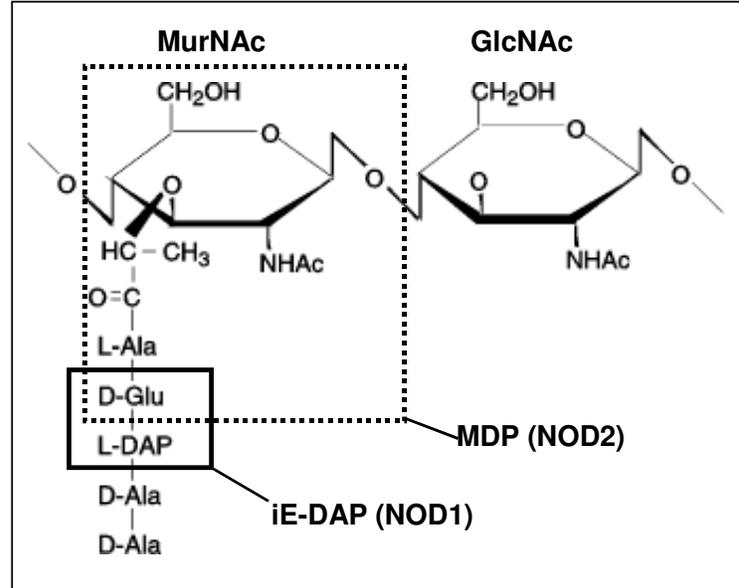


Abb. 2: Schematische Darstellung der Peptidoglykanstruktur. Gekennzeichnet sind γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) und Muramyl Dipeptid (MDP) innerhalb des Peptidoglykans, die von NOD1 bzw. NOD2 als minimalistische Struktur erkannt werden. Ala: Alanin; Glu: Glutaminsäure; GlcNAc: N-Acetylglucosaminsäure; MurNAc: N-Acetylmuraminsäure (modifiziert nach (Viarki et al. 1999), Essentials of Glycobiology).

Die Erkennung der PAMs durch NOD1 und NOD2 führt zu deren Selbst-Oligomerisation und anschließend zu einer transienten Rekrutierung des „receptor-interacting proteins 2“ (RIP2) durch CARD-CARD-Interaktionen. Der NOD-RIP2-Komplex rekrutiert anschließend den NF- κ B-Inhibitor-Kinase-Komplex (IKK), was zu einer Aktivierung von NF- κ B durch vorangegangene Phosphorylierung, Ubiquitierung und Degradierung des NF- κ B-Inhibitors (I κ B) führt (Ogura et al. 2001b).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Mutationen in der LRR-Region von NOD2 mit der Prädisposition für Morbus Crohn, einer chronischen inflammatorischen Erkrankung des Darmtraktes, in Verbindung stehen (Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001a). Durch eine Cytosin-Insertion an Position 1007 kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und Ausbildung eines Stop-Codons. MDP wird dadurch nicht mehr erkannt, was eine Dysregulation der NF- κ B Aktivierung zur Folge hat. Auch die „Missense“-Mutationen (Gly908Arg und Arg702Trp) werden mit Morbus Crohn in Verbindung gebracht (Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001a; Girardin et al. 2003a). Ein weiteres Beispiel ist das Blau Syndrom,

welches eine seltene Erbkrankheit ist, bei der es zu Hautausschlägen im Gesicht, Aderhaut-Entzündung und Arthritis kommen kann. Auch hier ist NOD2 in die Prädisposition für die Erkrankung involviert (Miceli-Richard et al. 2001).

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle intrazelluläre Rezeptoren bei der Induktion von AMP durch PAMs spielen. Primäres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des intrazellulären Rezeptors NOD2 auf die Expression des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in Keratinozyten zu untersuchen. Des Weiteren stellte sich die Frage, welche PAMs oder Mikroorganismen eine NOD2-vermittelte Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 induzieren können. Um einen Einblick in die Bedeutung anderer NLR-Proteine für die angeborene Abwehr der menschlichen Haut zu bekommen, wurde die Genexpression dieser Proteine in verschiedenen epithelialen Geweben und Zellen, insbesondere in primären Keratinozyten, analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Chemikalien

100 bp-DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Biozym Hess, Oldendorf
Bacto-Hefe-Extrakt	Gibco, Eggenstein
Bacto-Trypton	Gibco, Eggenstein
Bovines Kollagen	BD Biosciences, Bedford, USA
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
DMEM	Cellconcepts, Umkirch
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
EDTA	Gibco, Eggenstein
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Elilife	Cascade Biologics, Portland, USA
Eukitt	Kindler, Freiburg
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz
Fugene 6	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerin	USB, Cleveland, USA
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
MDP	Bachem, Heidelberg
MDP-LL	Bachem, Heidelberg
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin
Pepton (aus Sojamehl)	Unipath LTD, Hampshire, England
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RPMI 1640	Cell Concepts, Umkirch
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden über Merck (Darmstadt) oder Sigma-Chemie (Deisenhofen) bezogen.

2.1.2 Oligonukleotide

Die für die reverse Transkription und verschiedenen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden über die Firma Sigma-Genosys (Deisenhofen) bezogen. Die für die Klonierung verwendeten Primer wurden so konstruiert, dass sie an ihrem 5'-Ende jeweils eine Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in die verschiedenen Vektoren aufwiesen. Die für Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide besaßen eine 5'-Cy5 (Carbocyaninfarbstoff 5)-Markierung.

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')
NOD2-Überexpression:	
NOD2-ex-f1	GGGCTTTGATGGGGGAAGA
NOD2-ex-r1	AGTTTCGTTCTCAGACCACAG
NOD2-mut1-ex-f	AGAAGCCCTCCTGCAGGCCCTTGAAAGGAATGACACCATCCTG
NOD2-mut1-ex-r	CAGGATGGTGTCAATTCCTTTCAAGGGCCTGCAGGAGGGCTTCT
RT-PCR:	
Oligo(dT)	(T) ₁₈
„Realtime“-PCR:	
IPAF-f1	GACATTGGAGAGGGAATGGA
IPAF-r1	CAGTGCGGTGAGCTGTTCTA
GA-forw	CCAGCCGAGCCACATGGCTC
GA-rev	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
HBD-2-for1	GCCTCTTCCAGGTGTTTTTG
HBD-2-fA	ATCAGCCATGAGGGTCTTGT
HBD-2-rA	GAGACCACAGGTGCCAATTT
NALP1-f1	TCCATCCTGAGGAAGTCACC
NALP1-r1	TGGGGAGTATTTCCAGCATC
NALP2-f1	CTTGCTGCTGTGTTGGTTGT
NALP2-r1	TGGTTTCCTCAAAGCCTCAC
NALP3-f1	TTTACCTGCGAGGCAACACT
NALP3-r1	TCTGGCTGGAGGTCAGAAGT
NALP4-f1	GAAATCGGAGATGTGGGTGT
NALP4-r1	GAGCTGCTGCAGGGTCTTAC
NALP5-f1	ATTGAGGAGCAGTGGGAAGA
NALP5-r1	CTGCACACCAGGGTAATCT

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')
„Realtime“-PCR:	
NALP6-f1	CAATGACTGACCCACTGTGC
NALP6-r1	TCACTCAGCATACGCAGTCC
NALP7-f1	CATTGGGAAGAAGACCCTCA
NALP7-r1	CTGGTTGGCTTTGAGGACAT
NALP8-f1	AAGATGCTGACCCACCTGAG
NALP8-r1	ATCACCCCATCATCCTTCAG
NALP9-f1	GCAAGCTGAAACACCTCTCC
NALP9-r1	GGA CTTCGAAATGGAGTCA
NALP10-f1	GGAGGCTGTGAAAGTTGTCC
NALP10-r1	GCAAGTGATTCTGGGCTCTC
NALP11-f1	GTGGATGCTCTCATGGAGGT
NALP11-r1	ATGCTCCAGGGCTTTAGACA
NALP12-f1	GGACCTCTCTGCAGCTCTCA
NALP12-r1	GAAGCCATCTCCTGACAAGC
NALP13-f1	CATCCTTCAAAGGGACTTGG
NALP13-r1	GACCCTTCACAGAGGAAGCA
NALP14-f1	GGAGTGCAGCTTTTGTGTGA
NALP14-r1	GCCAAGCACAAATGTGTCAG
NOD1-f3	CAACGATGAAGTGGCAGAGA
NOD1-r3	ACTTTGGCCTCCTCTGGTTT
NOD2-f1	AAGCCTTGGCACTGATGCTG
NOD2-r3	CCTCCTCTAGAGAGAAAGTG
NOD3-f1	ACAGCACCCCTGAAGAACCTG
NOD3-r1	CTAAGCTGGTGAGGCTCCTG
NOD9-f1	CCAGTCAAGTGCACAGTGGT
NOD9-r1	AACAGGTCTCGGAGGTCCTT
NOD27-f1	CAGGGAATAGCATCAGCTCAG
NOD27-r1	CCAGATGGCTGAATGGTAGG
Sequenzierung und Kolonie-PCR:	
NOD2-seq-f1	GCCACGGTGAAAGCGAATGGA
NOD2-seq-f2	TGCAGGGCAACCTGCTGAAGA
NOD2-seq-f3	TCCAGTGCTTCTTTGCCGCGT
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG

siRNA:	
NOD2-A	UAUUGUUAUCGCGCAAUACAGAGC

Tab. 1: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.1.3 Enzyme

LightCycler-FastStart DNA Master	
SYBR GreenI	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase (SuperscriptII)	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Mikroorganismen

Im Folgenden wird eine tabellarische Zusammenstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen gegeben:

Stamm	Referenz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 33348, NTTC 11440
<i>Salmonella typhimurium</i>	C17, Klinisches Isolat aus dem Institut für Infektionsmedizin, Kiel
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2: Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.1.4.1 Kultivierung von *Salmonella typhimurium*

Die Bereitstellung, Kultivierung und anschließenden Stimulationsexperimente mit *Salmonella typhimurium* erfolgten im Institut für Infektionsmedizin in Kiel.

2.1.4.2 Herstellung von *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturüberständen

Die entsprechenden Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*) wurden mit Hilfe einer Impföse aus einer Glycerinkultur entnommen und mit dieser 5 ml TSB-Medium angeimpft (36 g Tryptic soy broth/l H₂O). Die Kultur wurde im Brutschrank unter ständigem Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die

Bakterienkulturen in der Verdünnung 1:20 in TSB-Medium überimpft und bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer optischen Dichte (OD_{620}) von 1 kultiviert. Diese Bakteriensuspension wurde dann in der Verdünnung 1:10 in TSB-Medium (Gesamtvolumen 50 ml) angeimpft und für 24 h unter statischen Bedingungen (adhärent) in 500 cm² Tripel-Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h wurde der Kulturüberstand durch zentrifugieren bei 6000 x g für 5 min von den Bakterien getrennt. Die Kulturüberstände wurden durch einen sterilen 0,2 µm-Filter (Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel) filtriert. Bis zur weiteren Verwendung wurde der *P. aeruginosa*-Kulturmedium-Überstand bei -20 °C gelagert.

2.2 Kultivierung humaner eukaryotischer Zelllinien

Die verschiedenen Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in 75 cm² Kulturgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) im Inkubator kultiviert.

2.2.1 CaCo-2-Zelllinie

Die humane Colonkarzinomzelllinie CaCo-2 („human colon adenocarcinoma“, DSMZ ACC 169) wurde in 10 ml DMEM-Medium („Dulbecco`s modified Eagle`s medium“) supplementiert mit 20 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

2.2.2 HEK293-Zelllinie

Die HEK293 („human embryonal kidney cells 293“)-Zelllinie ist eine humane embryonale Nierenzelllinie, die von Herrn Dr. Thorsten Maretzky aus dem Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt wurde. Das für die HEK293-Zellkultur verwendete Medium setzte sich zusammen aus DMEM-Medium supplementiert mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin,

100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin. Das Zellkulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt.

2.2.3 MKN-45-Zelllinie

Die humane Magenkarzinomzelllinie MKN-45 („human gastric adenocarcinoma, stomach“; DSMZ ACC 409) wurde in 10 ml RPMI-1640 supplementiert mit 20 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle zwei Tage.

2.2.4 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten

Primäre humane Keratinozyten wurden aus infantilen Vorhäuten, die bei chirurgisch indizierten Circumcisionen anfielen, gewonnen. Hierfür wurden die Vorhäute von Fett- und Bindegewebe befreit, in Streifen (ca. 2 x 5 mm) geschnitten und die Epidermis von der Dermis nach Inkubation in 25 ml 0,25 %iger Trypsinlösung (w/v in PBS) über Nacht bei 4 °C mechanisch getrennt. Das Trypsin wurde mit 20 ml FCS-haltigem DMEM-Medium inhibiert. Anschließend wurden die Keratinozyten durch Abschaben von den übrigen Zellschichten gelöst. Die Zellen wurden resuspendiert und nach einer Zentrifugation (800 x g, 5 min) in Kollagen-beschichteten Zellkulturflaschen mit 10 ml EpiLife-Medium ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die Lebensfähigkeit der Keratinozyten ließ ca. 3-4 Subkultivierungen zu. Um eine zu schnelle Ausdifferenzierung zu verhindern, wurden die Zellen schon bei niedriger Konfluenz passagiert.

2.2.5 Kollagenbeschichtung von Kulturflaschen und Kulturplatten

Primäre humane Keratinozyten zeigen *in vitro* und *in vivo* ein adhärentes Wachstumsverhalten. Keratinozyten produzieren Adhäsionsproteine, die sich *in vivo* an Strukturen der extrazellulären Matrix, andere Keratinozyten und die Basalmembran anheften. Um die Keratinozyten an die Plastikwand der Zellkulturflasche zu binden, bietet sich Kollagen an, das ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Basalmembran ist. Aus diesem Grund wurden

sämtliche zur Kultur, Transfektion und Stimulation von primären Keratinozyten verwendeten Zellkulturflaschen und 12- oder 24-Loch-Platten mit Kollagen beschichtet. Für die Beschichtung der Zellkulturgefäße diente bovines Kollagen (2,9 mg/ml; BD Biosciences, Bedford, USA), 1 %ig in HCl gelöst. Zellkulturflaschen wurden mit je 5 ml, 12-Loch-Platten mit je 0,3 ml pro Loch und 24-Loch-Platten mit je 0,15 ml pro Loch befüllt. Die Flaschen und Platten wurden nach einer 3-stündigen Inkubation bei 37 °C zweimal mit PBS gewaschen.

2.2.6 Subkultivierung humaner eukaryotischer Zelllinien

Zur Subkultivierung wurden die adhärent wachsenden CaCo-2-, HEK293-, MKN-45-Zellen (Konfluenz etwa 80-90 %) und primären Keratinozyten (Grad der Ausdifferenzierung für den Zeitpunkt der Subkultivierung entscheidend) zunächst einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 0,1 % Trypsin und 0,02 % Ethyldiamintetraacetat (EDTA) enthaltenden Lösung für 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Klopfen an die Kulturflasche vollständig vom Kulturgefäßboden abgelöst. Anschließend wurde die Trypsinbedingte enzymatische Proteolyse durch Zugabe von 10 ml FCS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellen bei 800-1200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation dekantiert und das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert. Entsprechend der gewünschten Zellzahl wurde die Zellsuspension weiter verdünnt, in sterile Kulturflaschen eingesät (Subkultivierung) bzw. für Stimulations- und Transfektionsversuche in 12- oder 24-Loch-Kulturplatten (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986) ist es möglich, *in vitro* enzymatisch von bestimmten Nukleotidsequenzen millionenfach Kopien herzustellen.

Dieser als Amplifikation bezeichnete Vorgang ermöglicht es, auch sehr geringe Mengen von DNA-Fragmenten spezifisch zu amplifizieren.

Die PCR wurde für die Amplifikation der NOD2-cDNA zur Klonierung in den Überexpressionsvektor angewendet. Außerdem diente die PCR zur Überprüfung von Plasmiden auf ein insertiertes PCR-Produkt. Die Reaktionen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 30 oder 50 µl in einem Thermocycler (Trio-Block; Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die PCR, bestehend aus den Phasen Denaturierung, Primer-Anlagerung und Kettenverlängerung, wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Spezifität der Oligonukleotid-Primer in Bezug auf die vom Hersteller angegebenen Schmelzpunkte (Sigma-Genosys, Deisenhofen) variiert. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt.

2.3.2 Zur Verfügung gestellte Promotor-Vektor-Konstrukte

Eukaryotische Zellen wurden mit einem hBD-2-Promotor-Vektor-Konstrukt transfiziert (2.3.4), das eine Analyse der hBD-2-Promotoraktivierung durch Messung der Luziferaseaktivität ermöglicht. Das hier verwendete Luziferase-Reporterplasmid war der pGL3-basic-Vektor (Promega, Madison, USA), der als Funktionseinheit eine für die „Firefly“-Luziferase kodierende cDNA-Region enthält. Ein 2338 bp enthaltendes Fragment des hBD-2-Promotors wurde in den pGL3-basic-„Firefly“-Luziferase-Vektor kloniert. Die Aktivierung des einklonierten hBD-2-Promotors ließ sich über die relative Aktivität der „Firefly“-Luziferase mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems (Promega, Mannheim) analysieren und auswerten (2.4.6). Um die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF-κB zu messen, wurde ein „Firefly“-Luziferase-Vektor pNF-κB-Luc (Clontech, Mountain View, USA) verwendet.

Die verwendeten hBD-2-Promotor-Konstrukte wurden von Herrn PD Dr. rer. nat. Jürgen Harder zur Verfügung gestellt. Die hBD-2-Promotor-Konstrukte sind in Abbildung 8 (Ergebnisteil) schematisch dargestellt. Das Protokoll zur Herstellung findet sich in einer Veröffentlichung von Jan Wehkamp et al. (Wehkamp et al. 2004a).

2.3.3 Herstellung der NOD2-Überexpressionsplasmide

2.3.3.1 Amplifikation der vollständigen NOD2-cDNA aus genomischer DNA

Zur Amplifikation der NOD2-Gene für die Klonierung in die Expressionsvektoren wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Diese aus *Pyrococcus furiosus* stammende DNA-Polymerase besitzt im Gegensatz zu der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, durch welche falsch eingebaute Nukleotide entfernt werden („proof reading“) und somit die Genauigkeit der DNA-Synthese erhöht wird (Kunkel 1992).

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 5,0 µl 10x *Pfu*-cloned-buffer
- 5,0 µl dNTPs (2 mM)
- 2,5 µl genspezifischer Vorwärts-Primer (10 µM)
- 2,5 µl genspezifischer Rückwärts-Primer (10 µM)
- 3,0 µl genomische DNA (200 ng/µl)
- 22 µl H₂O
- 1,0 µl *Pfu*-Polymerase in 9 µl H₂O, Zugabe erst bei 85 °C

Die PCR wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- | | |
|----------------|------------------------------------|
| 95 °C - 2 min | |
| 85 °C - 1 min | -Zugabe der <i>Pfu</i> -Polymerase |
| 94 °C - 1 min | } 32 Zyklen |
| 60 °C - 30 s | |
| 72 °C - 5 min | |
| 72 °C - 10 min | |
| 4 °C - ∞ | |

Nach der Amplifikation wurde das Amplifikationsprodukt 30 Minuten mit 0,5 µl *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) bei 72 °C inkubiert, wodurch A-Überhänge entstehen.

Das Amplifikationsprodukt wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft und mit dem Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert (2.3.3.2). Anschließend wurde das Produkt in den Vektor pEF6/V5-His-TOPO ligiert (2.3.3.3) und in kompetente *Escherichia coli*-Zellen transformiert (2.3.3.5). Der Erfolg der Transformation wurde durch eine Kolonie-PCR überprüft (2.3.3.6) und anschließend durch eine DNA-Sequenzierung analysiert (2.3.3.7).

2.3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Amplifikationsprodukte (2.3.3.1) wurde die horizontale Gelelektrophorese mit 1-2 %igen (w/v) Agarose-Gelen genutzt. Bei der Herstellung der Gele wurde Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 40 mM Essigsäure, 1 mM Na₂EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 7 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben und die Lösung in eine horizontale Gießvorrichtung (Horizon 11·14; Gibco BRL, Karlsruhe) gegossen. Die DNA wurde zum Auftragen auf das Gel mit DNA-Auftragspuffer versetzt (0,1 M EDTA, 50 % Glycerin (v/v), 1 % Bromphenolblau (w/v), 1 % Xylencyanol (w/v), 0,1 % SDS (w/v)). Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer für 30-45 min bei 100 V (ca. 60 mA). Nach der Auftrennung wurden die Banden durch die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei 266 nm detektiert und mit Hilfe einer BioDoc-Fotodokumentationsanlage (Biometra, Göttingen) digital dokumentiert.

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus der PCR für anschließende Ligationen erfolgte über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese. Plasmid-DNA wurde in einem 1 %igen, PCR-Produkte in einem 2 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf einem UV-Bildschirm sichtbar gemacht und aus dem Gel herausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.3.3.3 Ligation von Vektor und Promotorfragmenten

Zur Ligation der PCR-Amplifikationsprodukte in den pEF6/V5-His-TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) wurde folgender Ansatz vorbereitet:

- 1,0 µl T4-DNA-Ligase (1 U; New England BioLabs, Beverly, USA)
- 0,5 µl pEF6/V5-His-TOPO-Vektor
- 4,0 µl Amplifikationsprodukt
- 1,0 µl T4-Ligase-Puffer (New England BioLabs, Beverly, USA)
- 4,0 µl H₂O

Die Ligationsreaktion erfolgte zunächst bei 25 °C für 30 min, woran sich ein weiterer dreißigminütiger Inkubationsschritt bei 22 °C anschloss. Als Kontrolle wurde der Vektor ohne Fragment eingesetzt, um abschätzen zu können, inwieweit der Vektor mit sich selbst religiert.

Die vollständige cDNA von NOD2 wurde in den Expressionsvektor pEF6/V5-His-TOPO kloniert. Das resultierende NOD2-überexprimierende Plasmid (NOD2-pEF6/V5-His) wurde anschließend durch Sequenzierung analysiert (2.3.3.7).

2.3.3.4 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Zur Herstellung CaCl₂-kompetenter *Escherichia coli* TOP10 F'-Zellen wurde das Protokoll des T-Cloning Kit Manuals der Firma Fermentas (Vilnius, Litauen) teilweise befolgt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 5000 x g und 4 °C. Es wurden 40 ml LB-Medium (0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0) 1 %ig (v/v) mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD₆₂₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min auf Eis gelagert, dann 15 min zentrifugiert und der Kulturüberstand dekantiert. Nach Aufnahme der Zellen in 20 ml eiskaltem TBS-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris/HCl pH 7,0) wurden diese für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert (100 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris/HCl pH 7,0), 20 min auf Eis inkubiert und 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und mit 500 µl 86 %igem Glycerin versetzt. Zur anschließenden Lagerung der Zellen bei -80 °C wurden 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.3.3.5 Transformation

Für Transformation des Ligationsansatzes (2.3.3.3) in kompetente *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli* TOP 10 F', Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde 1 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl kompetenten *E. coli*-Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für 30 s, wurde der Ansatz erneut 3 min auf Eis gelagert. Dann wurden 125 µl SOC-Medium (0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM D-Glucose) zugegeben. Der Transformationsansatz wurde für 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler bei 200 Upm inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf TSB-Agarplatten, die das Resistenzantibiotikum des Vektors (Carbenicillin, 100 µg/ml) enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Klone wurden über eine Kolonie-PCR (2.3.3.6) auf das korrekte

Plasmid überprüft und das Plasmid über ein Mini- oder Maxipräparationskit (Macherey-Nagel, Düren bzw. Qiagen, Hilden) nach Angaben der Hersteller aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der eluierten Plasmide erfolgte photometrisch bei 260 nm (2.5.1.2).

2.3.3.6 PCR zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung (Kolonie-PCR)

Um die Plasmide auf insertierte PCR-Produkte der erwarteten Länge zu testen, wurden einige der aus der Transformation erhaltenen Kolonien (2.3.3.5) mittels einer sterilen Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 20 µl PCR-Mix überführt. Ohne Insert wurde nur die Klonierungsstelle amplifiziert, während mit Insert ein entsprechend größeres PCR-Fragment amplifiziert wurde. Als Primer wurden der T7 Promotor-Primer und der BGH Reverse-Primer entsprechend den Angaben der Firma Invitrogen verwendet (siehe Tabelle 1). Die Ansätze wurden zur Denaturierung der DNA 5 min auf 95 °C erhitzt. Der PCR-Ansatz bestand aus:

- 3,0 µl 10x Reaktionspuffer
- 3,0 µl dNTPs (2 mM)
- 0,9 µl MgCl₂ (50 mM)
- 1,0 µl T7 Promotor-Primer (10 µM)
- 1,0 µl BGH Reverse-Primer (10 µM)
- 11,1 µl H₂O
- 0,2 µl *Taq*-Polymerase in 9,8 µl H₂O, Zugabe erst bei 85 °C

Folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler (Trio-Block; Biometra, Göttingen) wurde verwendet:

95 °C - 5 min	
85 °C - 1 min	-Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase
94 °C - 1 min	} 30 Zyklen
58 °C - 20 s	
72 °C - 5 min	
72 °C - 5 min	
4 °C - ∞	

Anschließend wurden die PCR-Ansätze durch eine DNA-Sequenzierung analysiert (2.3.3.7).

2.3.3.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Methode der Zyklus-Sequenzierung (Innis et al. 1988), deren Grundlage die Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1992) ist. Hierfür wurde das SequiTherm EXCEL II Long-Read DNA Sequencing Kit-Alf (Biozym Diagnostic, Oldendorf) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden Cy5-markierter Sequenzierprimer (Tab. 1) verwendet. Die Auswertung erfolgte fluorimetrisch mit einem Alf-Express DNA Sequencer™ (Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Das Computerprogramm Sequencing-Analyzer (Pharmacia, Freiburg) diente zur Analyse der Daten.

2.3.3.8 PCR zur Generierung mutierter Expressionsplasmide

Um die 3020InsC-Mutation in das NOD2-Expressionsplasmid NOD2-pEF6/V5-His einzufügen, wurde das QuickChange™ XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Mutationsprimer NOD2-mut1-ex-f und NOD2-mut1-ex-r verwendet. Das daraus entstandene Plasmid, das die NOD2-3020InsC-Mutation trägt (NOD2-3020InsC-pEF6/V5-His), wurde durch eine Sequenzierung (2.3.3.7) verifiziert.

Folgender Reaktionsansatz für die Mutations-PCR wurde verwendet:

- 3,0 µl 10x *Pfu*-reaction-buffer (Stratagene)
- 2,0 µl Quicksolution (Stratagene)
- 0,6 µl dNTPs (2 mM)
- 0,6 µl genspezifischer Vorwärts-Primer (NOD2-mut1-ex-f) bzw. genspezifischer Rückwärts-Primer (NOD2-mut1-ex-r), je (10 µM)
- 1,7 µl Plasmid NOD2-pEF6/V5-His (30 ng/µl)
- 12,1 µl H₂O
- 0,6 µl *Pfu*-Polymerase in 9,4 µl H₂O, Zugabe erst bei 85 °C

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 95 °C - 3 min
- 85 °C - 1 min -Zugabe der *Pfu*-Polymerase
- 94 °C - 1 min } 11 Zyklen
- 60 °C - 1 min }
- 68 °C - 8 min }
- 12 °C - ∞
- 4 °C - ∞ -Vermischen der beiden Reaktionsansätze

94 °C - 1 min }
60 °C - 1 min } 9 Zyklen
68 °C - 8 min }
4 °C - ∞

Anschließend wurde die Template-DNA durch Zugabe von 1,2 µl *DPMI* für 1 h bei 37 °C hydrolysiert.

2.3.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Als Transfektion wird die Einschleusung von DNA in Säugetierzellen verstanden. Dabei liegt die DNA meist in Form von Plasmiden vor.

2.3.4.1 Transfektion mit Fugene 6 und ProteoJuice

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien mit Vektorkonstrukten (2.3.2) und Überexpressionsplasmiden (2.3.3) transfiziert, um die Aktivierung der verschiedenen Promotorregionen bzw. die Überexpression von NOD2 zu untersuchen.

Die lipid-basierende Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Fugene 6 (Roche Diagnostics, Mannheim), das mit der DNA einen Komplex bildet und diese dann in die Zelle transportiert. Die transfizierten Vektoren werden durch das Transfektionsreagenz zunächst nur in die Zelle, nicht aber in den Zellkern gebracht. Die Transfektion erfolgt bei einer Zellkonfluenz von 60-80 %, damit sich die Zellen nach der Transfektion noch einmal teilen können, um eine Transkription der Vektor-DNA im Kern erfolgen zu lassen. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen dazu in 12- bzw. 24-Loch-Platten ausgesät.

Zur Messung der relativen hBD-2- und NF-κB-Promotoraktivierung bei HEK293-Zellen wurde grundsätzlich ein „Renilla“-Luziferase-Vektor phRG-TK (Promega, Mannheim) und ein „Firefly“-Luziferase-Vektor (Promega, Mannheim) pro Versuch transfiziert. Um die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF-κB zu messen, wurde ein „Firefly“-Luziferase-Vektor pNF-κB-Luc (Clontech, Mountain View, USA) verwendet. Ein 2338 bp enthaltendes Fragment des hBD-2-Promotors wurde in einen promotorfreien pGL3-basic-„Firefly“-Luziferase-Vektor kloniert (2.3.2). Durch Transfektion dieses Konstruktes in die Zellen konnte die relative hBD-2-

Promotoraktivierung ermittelt werden. Pro Ansatz (1 Loch einer 12-Loch-Platte; für 24-Loch-Platten entsprechend die Hälfte) wurden 75 ng des jeweiligen Reporterplasmids, 30 ng des NOD2-Überexpressionsplasmids oder des leeren Kontrollvektors und 10 ng Renilla-Luziferase-Vektor phRG-TK zu 100 µl zusatzfreiem Medium gegeben und 1 µl Fugene 6 hinzugefügt. Zur Bildung des DNA-Lipidkomplexes wurde die Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der 12-Loch-Platte mit PBS, wurden je 400 µl Medium vorgelegt. Nach der Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz (100 µl) tropfenweise auf ein Loch der Kulturplatte gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Nach 24 h wurden die Zellen in 350 µl zelllysierenden Puffer („passive lysis buffer“, Promega, Mannheim) aufgenommen und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Luziferaseaktivität der Zelllysate wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim) gemessen (2.4.6).

In einigen Experimenten wurden HEK293-Zellen 16 h mit 0,5 µg CMV-IκB-DN transfiziert, welches die Überexpression einer mutierten IκB (Inhibitor von NF-κB) Variante erlaubt. Dieses Plasmid wurde von Frau Dr. Dagmar Kulms aus Münster zur Verfügung gestellt. In einem anderen Inhibierungsversuch wurden die Zellen 1 h mit Helenalin (4 µM) vorinkubiert und anschließend die Transfektion durchgeführt.

Für Stimulationsversuche mit *Salmonella typhimurium* (MKN-45- und CaCo-2-Zellen) und mit *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturüberständen (primäre Keratinozyten) wurden die Zellen am Vortag transfiziert. Je 2 µl Fugene 6 und 1 µg NOD2-Expressionsplasmid oder Kontrollplasmid wurden zu 100 µl zusatzfreiem Medium gegeben. Nach Waschen der 12-Loch-Platte mit PBS, wurden die für 30 min bei Raumtemperatur inkubierten Transfektionsansätze (s.o.) zu je 400 µl vorgelegtem Medium gegeben

Bei Untersuchungen zur MDP-induzierten hBD-2-Sekretion in primären Keratinozyten wurden je 1,25 µl des Transfektionsreagenz ProteoJuice (Merck, Darmstadt) benutzt, um die Zellen mit verschiedenen MDP-Konzentrationen zu stimulieren.

Die Transfektion der *Stealth*-siRNA mit dem Reagenz Lipofectamine 2000 wird in Abschnitt 2.3.4.2 beschrieben.

Nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert oder geerntet und je nach Bedarf eine Proteinisolierung und -analyse vorgenommen. Zum Nachweis der NOD2-Überexpression wurden aus den transfizierten Zellen Proteine für Westernblot-Analysen (2.4.3.2) und RNA für „Realtime“-PCR-Analysen (2.5.1.4) isoliert. Die Zellkulturüberstände wurden in einem ELISA (2.4.4) untersucht.

2.3.4.2 „Knock-down“-Experimente an primären humanen Keratinozyten mit „Stealth“-siRNA

Die neue Methode der RNA Interferenz (Fire et al. 1998) hat sich zu einem wichtigen Werkzeug beim spezifischen Ausschalten („knock-down“) von Genen in einer Vielzahl von Organismen sowie in menschlichen Zelllinien entwickelt. Die sogenannten „small interfering RNAs“ (siRNA, 21-23 Nukleotide) entstehen bei diesem Mechanismus durch das Schneiden langer dsRNAs durch den Dicer-Enzymkomplex. Die siRNA bildet mit einem Proteinkomplex den sogenannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC), welcher wiederum an den antisense-Strang des 21-mers bindet. Dabei wird die mRNA in der Mitte des Hybrides geschnitten. Die Degradation der mRNA führt zum „gene silencing“ auf posttranskriptionaler Ebene.

Es wurden Experimente mit „Stealth“-siRNA an primären Keratinozyten durchgeführt, die selektiv die Expression von NOD2 inhibieren sollte, um zu überprüfen, ob die Aktivierung von NOD2 durch den Liganden MDP zu einer Induktion von hBD-2 führt. Es wurde für die humanen Keratinozyten eine doppelsträngige „Stealth“-siRNA für NOD2 von der Firma Invitrogen verwendet (siehe Tabelle 1). Als Kontrolle diente eine unspezifische dsRNA von Invitrogen. Primäre Keratinozyten wurden in 12-Loch-Platten kultiviert und bei einer Konfluenz von 50-70 % für die Transfektion benutzt. Die Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. 1 µl siRNA (20 µM) und 1 µl Lipofectamine 2000 wurden in je 250 µl Epilife Medium ohne Zusätze verdünnt. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze vereinigt und für weitere 20 min inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde für 5 h auf die Zellen gegeben. Danach wurde das Medium mit frischem Epilife Medium ausgetauscht. Nach 20 h wurden die Zellen mit dem NOD2-Liganden MDP (auch MDP-LD genannt; Bachem, Heidelberg) oder dem biologisch inaktiven Isomer MDP-LL (Bachem, Heidelberg), bei dem die zweite Aminosäure D-Isoglutamin gegen

L-Isoglutamin ausgetauscht wurde, behandelt. Das Einbringen von MDP in die Zelle wurde durch das Protein-Transfektionsreagenz ProteoJuice (Novagen, Madison, USA) ermöglicht. Es wurden 0,6 µl ProteoJuice für 20 Minuten in 50 µl Epilife inkubiert, das unterschiedliche Konzentrationen an MDP enthielt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in 450 µl Epilife Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 2,5 h wurde das Medium verworfen und durch frisches Epilife Medium, welches 0,1 % BSA enthielt, ersetzt. Die Stimulation wurde für 7 h durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden mit einem hBD-2-ELISA untersucht (2.4.4), und die Zellen, nachdem diese zweifach mit PBS gewaschen wurden, für eine RNA-Isolierung (2.5.1.1) benutzt.

2.3.5 Stimulation der Zellen

Die Stimulation der eukaryotischen Zelllinien erfolgte in 12-Loch- oder 24-Loch-Platten, dabei wurden teilweise zuvor transfizierte Zellen stimuliert. Als Stimulantien wurden proinflammatorischen Zytokine wie IFN- γ , IL-1- β und TNF- α (20 ng/ml, Cell Concepts, Umkirch, Stammlösung 10 ng/ul in H₂O), der Phorbolster Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA, 50 ng/ml) und Kulturmediumüberstände von *Pseudomonas aeruginosa* (50-60 µl/ml, Herstellung siehe 2.1.4.2) verwendet. Zudem wurden Stimulationsexperimente mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* (6×10^6 Zellen/ml) durchgeführt (2.1.4.1). Der Stimulus wurde in der gewünschten Konzentration in serumfreiem DMEM-, RPMI-Medium bzw. Keratinozyten-Medium (bei Stimulation mit *Salmonella typhimurium* Antibiotika-freies Medium) mit 0,1 % Albumin (BSA, w/v) aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Die Zugabe von BSA sollte dabei eine mögliche unspezifische Wechselwirkung des Stimulus mit der Gefäßwand verhindern. Die Stimulationszeit betrug je nach Experiment 6-24 h. Unmittelbar nach der Stimulationszeit wurden die Zellen dem geplanten Versuch nach entsprechend lysiert. Die Überstände wurden gesammelt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Aufschluss eukaryotischer Zellen

Um die NOD2-Proteinexpression in eukaryotischen Zellen mittels ELISA (2.4.4) oder Westernblot (2.4.3.2) zu analysieren, wurden die Zellen mit einem Zellschaber in PBS von der Zellkulturplatte gelöst und für 15 min bei 10000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in Lysispuffer (1 % Triton X-100, Protease Inhibitor Mixture; Roche Diagnostics, Mannheim) aufgenommen. Die Zellen wurden per Ultraschall (10 Intervalle) lysiert, weitere 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Die Proteinkonzentration in den Überständen wurde wie unter 2.4.2 beschrieben bestimmt.

Zur Analyse der NOD2-Proteinexpression in primären Keratinozyten wurden 2×10^6 Zellen mit 1 μ l NOD2-spezifischen Kaninchen-Antikörpern (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) mittels eines Immunopräzipitation Kits (Protein G; Roche Diagnostics, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers immunopräzipitiert.

2.4.2 Proteinbestimmung

Um die Proteinkonzentration von Zellysaten (2.4.1) quantitativ zu bestimmen, wurden die Lösungen des BIORAD DC Protein Assays (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Extinktion wurde bei 620 nm mit einem Spektralphotometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) bestimmt. Anhand einer Standardkurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen konnte aus den gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentrationen berechnet werden.

2.4.3 Gelelektrophorese und Westernblot

2.4.3.1 Gelelektrophorese

Für Westernblotanalysen (2.4.3.2) wurde eine Novex Mini-Cell Gelkammer mit NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Gelen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die durch Lysispuffer und Immunopräzipitation vorbereiteten Proben (2.4.1) wurden mit 4 x

NuPAGE™ LDS Auftragspuffer (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Proben (30 µg) wurden zusammen mit einem molekularen Größenstandard (SeeBluePlus2 Pre-Stained Standard 1 x; Invitrogen, Karlsruhe) auf ein Gel aufgetragen. Das Gel lief etwa 1 h bei 200 V.

2.4.3.2 Westernblot

Um NOD2-Proteine nachzuweisen wurde ein Westernblot durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst elektrophoretisch in einem Gel aufgetrennt (2.4.3.1). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mit einem Modul („XCell II™ Blot Module“; Invitrogen, Karlsruhe) auf eine Nitrozellulosemembran (Invitrogen, Karlsruhe) transferiert. Zum Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Zellulosemembran wurde für 60 min eine Spannung von 200 V angelegt. Danach wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h in Blockierungspuffer (5 % fettfreies Magermilchpulver (w/v) in PBS mit 0,05 % Tween) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 18 h bei 4 °C mit 1:4000 verdünntem NOD2-spezifischen Kaninchen-Antikörpern (in 3 % fettfreiem Magermilchpulver (w/v) in PBS mit 0,05 % Tween) inkubiert. Nach der Inkubation mit primärem Antikörper wurde das Medium entfernt, die Membran sechsmal mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween) gewaschen und mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Ziege IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg; 1:20000 in PBS verdünnt) für 1 h inkubiert. Nach erneutem, sechsmaligen Waschen erfolgte die Detektion mit Hilfe des CPS („chemiluminescent peroxidase substrate“)-Detektionsreagenz (Sigma, Deisenhofen) nach Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenz wurde in einer Dunkelkammer mit einem digitalen Detektionssystem („Diana III cooled CCD camera imaging system“; Raytest, Straubenhardt) visualisiert.

2.4.4 HBD-2-ELISA

Im ELISA-Verfahren („enzyme-linked immunosorbent assay“) wird das zu quantifizierende Protein mit einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. Spezifische Antikörper binden an den nachzuweisenden Stoff (Antigen). Die Antikörper werden zuvor mit einem Enzym markiert. Mit Hilfe dieses Enzyms wird

anschließend eine Farbreaktion ausgelöst, deren Intensität proportional zur Konzentration in der Probe ist.

Zur Untersuchung der Expression und der Sekretion von hBD-2 in Überständen und Zelllysaten von eukaryotischen Zellen wurde ein hochsensitiver ELISA („Sandwich-ELISA“) verwendet. Für den ELISA wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno Plate Maxisorp, Nunc GMBH, Wiesbaden) bei 4 °C für 20 h mit je 50 µl polyklonalem, affinitätsgereinigtem hBD-2-Antikörper (Pepro Tech, Rocky Hill, USA), welcher 1:500 in 0,05 M Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt wurde, beschichtet. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Lochinhalte verworfen und durch eine zehninütige Inkubation mit 200 µl 1 %iger (w/v) boviner Serumalbumin-Lösung (BSA) in PBS unspezifische Proteinbindungen abgesättigt. Danach wurden alle Reaktionslöcher dreimal mit je 200 µl Waschpuffer (0,01 % Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4) gewaschen. Je 100 µl der zu testenden Kulturmediumüberstände sowie eine hBD-2-Konzentrationsreihe (0,3 bis 20 ng/ml, aufgereinigtes hBD-2-Protein) als Standard wurden in die 96-Loch-Mikrotiterplatten gegeben und 30 min inkubiert. Die Reaktionslöcher wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen, anschließend mit 50 µl biotinyliertem hBD-2-Antikörper (Cell Concepts, Umkirch), der mit Waschpuffer 1:2500 auf eine Konzentration von 0,2 µg/ml verdünnt war, befüllt und für 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Platte wurden 50 µl Streptavidin-POD (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers zugegeben und für 30 min inkubiert. Die 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und als Entwicklungsreagenz je 100 µl 2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure (ABTS, Roche Diagnostics, Mannheim) in jedes Loch zugegeben. Die Entwicklungszeit betrug 15 min und wurde im Dunkeln durchgeführt. Die einsetzende Färbereaktion wurde durch Messung der Absorption bei 405 nm in einem Multikanal Photometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) bestimmt.

2.4.5 Immunhistochemische Färbung

In Paraffin eingebettete Hautgewebestücke aus dem Archiv der Kieler Hautklinik wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt, um immunhistochemische Untersuchungen durchführen zu können. Zunächst wurden mit einem Mikrotom

4-6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Diese wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet. Zum Entparaffinisieren wurden die Schnitte mit Xylolersatz und einer absteigenden Alkoholreihe behandelt und rehydriert. Um die Antigene zugänglicher zu machen, wurden die Präparate 20 min bei 90 °C in 10 mM Citratpuffer erhitzt und anschließend 60 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden die Präparate 5 min in TBS ("Tris-buffered saline") gespült. Im Anschluss wurden die Präparate für 10 min mit 12 % BSA inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 16 h bei 4 °C mit dem primären NOD2-Antikörper (NOD2 Polyclonal Antiserum; Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) in einer Verdünnung von 1:500 in TBS inkubiert. Die Entfernung des primären NOD2-Antikörpers erfolgte durch Spülen in TBS. Die Schnitte wurden für 30 min mit einem biotinylierten Sekundärintikörper (Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobuline, 1:100, v/v in TBS 1 % BSA; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) beschichtet. Nach erneutem Spülen in TBS wurde das Vectastain ABC-System (Avidin-Biotin-Complex, 1:100, v/v in TBS; Vector, Burlingame, USA) auf die Schnitte gegeben und 30 min inkubiert. Die Präparate wurden anschließend in Tris-TBS (pH 8,2-9,5) gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte schließlich durch das Auftragen des AP-Komplexes (Alkalischer Phosphatase-Komplex; Vector, Burlingame, USA) nach Angaben des Herstellers. Es erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung; Merck, Darmstadt). Die Schnitte wurden mit Eukitt (Kindler, Freiburg) eingedeckelt. Als Kontrolle dienten Schnitte ohne Behandlung mit Primärintikörper, wobei die Schnitte sonst auf gleiche Weise behandelt wurden. Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop (Axioskop) der Firma Zeiss (Zeiss, Oberkochen), und zur Dokumentation wurden Fotos mit einer Digitalkamera von Leica aufgenommen.

2.4.6 Luziferase-Assay

Zur Vorbereitung der Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Jedes Loch einer 12-Loch-Platte wurde mit 350 µl bzw. jedes Loch einer 24-Loch-Platte wurde mit 175 µl zelllyisierenden Puffers („passive Lysis Buffer“, Promega, Mannheim) befüllt (siehe auch 2.3.4.1). Danach wurden die Zellkulturplatten 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, um eine ausreichende Lysierung der Zellen zu erzielen. Der Luziferase-Assay wurde

mit dem „Dual-Luciferase reporter assay system“ (Promega, Mannheim) durchgeführt. Die Lumineszenz wurde im Luminometer (TD-20/20 Luminometer, Turner Designs, Sunnyvale, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers gemessen. Dabei wurden die Aktivitäten der „Firefly“-Luziferase und der „Renilla“-Luziferase getrennt gemessen. Alle Lumineszenz-Messungen erfolgten mit einer Vorlaufzeit von 2 Sekunden für eine Dauer von 10 Sekunden. Das Gen für die „Renilla“-Luziferase findet sich auf dem Kontrollvektor phRG-TK (Promega, Mannheim), der stets ko-transfiziert wurde. Die Aktivität der „Renilla“-Luziferase diente als Maß für die Transfektionseffizienz, und das Verhältnis von „Firefly“- zu „Renilla“-Luziferase-Aktivität wurde jeweils berechnet.

2.5 Genexpression in Epithelzellen

2.5.1 Semiquantitative RT-PCR

2.5.1.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus den kultivierten Epithelzellen wurde nach der „Single“-Step-Methode mit Hilfe des TRIzol™-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert. Das Reagenz besteht aus einem Phenol-Guanidinisothionat-Gemisch. Die Zellen wurden aufgeschlossen und Zellkomponenten gelöst, ohne dass die RNA gespalten wurde. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Die RNA verbleibt ausschließlich in der wässrigen Phase, aus der sie mit Isopropanol gefällt werden kann. Die Präparation wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die RNA-Isolierung aus den kultivierten Epithelzellen wurde jeweils 0,25 ml „TRIzol™“-Reagenz je Vertiefung einer 24-Loch-Platte bzw. jeweils 0,5 ml „TRIzol™“-Reagenz je Vertiefung einer 12-Loch-Platte verwendet. Die isolierte RNA wurde in 15-25 µl 25 %-Formamid-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.1.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten RNA (2.5.1.1) wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm (A_{260}) in einem UV-Detektor mit automatischer Quantifizierung (Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Eine A_{260} -Extinktion von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 41,2 $\mu\text{g/ml}$ (Sambrook et al. 1989).

2.5.1.3 Reverse Transkription (RT) von RNA (cDNA-Synthese)

Die aus Zellen isolierte RNA (2.5.1.2) wurde zur weiteren Analyse durch reverse Transkription in stabilere komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Bei diesem Prozess der reversen Transkription wird die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase genutzt (Gallo 1971). Pro Reaktionsansatz wurde 1 μg Gesamt-RNA und 1,5 μl Oligo(dT)-Primer (20 μM) mit H_2O auf ein Volumen von 12,5 μl gebracht und zur Denaturierung der RNA 10 min bei 70 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach Abkühlen auf 42 $^\circ\text{C}$ wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

- 4,0 μl 5x Reaktionspuffer (Invitrogen, Karlsruhe)
- 2,0 μl DTT (0,1 M; Invitrogen, Karlsruhe)
- 1,0 μl dNTPs (10 mM; Pharmacia, Freiburg)
- 0,5 μl Reverse Transkriptase (Superscript-II; Invitrogen, Karlsruhe)

Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 $^\circ\text{C}$. Anschließend wurden die Ansätze zur Inaktivierung des Enzyms für 5 min auf 90 $^\circ\text{C}$ erhitzt. Die so gewonnene cDNA wurde durch Zugabe von 80 μl H_2O auf ein Gesamtvolumen von 100 μl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 $^\circ\text{C}$ gelagert.

Für die Untersuchung verschiedener humaner Gewebe mit RT-PCR wurde cDNA verwendet, die nach dem oben beschriebenen Protokoll aus Gesamt-RNA der Firma Clontech hergestellt wurde.

2.5.1.4 „Realtime“-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Ermittlung der relativen Genexpression von hBD-2 und NOD2 wurde die zuvor durch reverse Transkription hergestellte cDNA mittels „Realtime“-PCR analysiert. Der Vorteil dieser PCR-Methode liegt darin, dass auch mRNA-Moleküle, die nur in geringer Konzentration in der Zelle vorkommen, nachgewiesen werden können.

Dafür wurde eine PCR-Analyse mit zwei genspezifischen Primern (GSP 1 und GSP 2) durchgeführt. Bei dieser Methode wurden Intron-überspannende Primer (Tabelle 1) eingesetzt, um cDNA von genomischer DNA unterscheiden zu können. Die Vervielfältigung des untersuchten Gens über die einzelnen Zyklen lässt sich durch einen speziellen Farbstoff (SYBR Green I; Roche, Mannheim) kontinuierlich messen und ermöglicht so eine Berechnung der ursprünglichen cDNA-Konzentration. Zur Ermittlung eines internen Standards wurden Primer verwendet, die ein spezifisches, 360 bp großes Fragment der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifizieren, die in Epithelzellen konstant exprimiert wird. Die verwendeten Primer (GA-forw, GA-rev) sind in Tab. 1 dargestellt. Die PCR-Reaktionen erfolgten dabei unter Verwendung eines „Realtime“-Cyclers der Firma Roche (Light Cycler; Roche Diagnostics, Mannheim). Dabei wurden 10 ng cDNA je Reaktionsansatz eingesetzt:

-5,8 µl H₂O
-1,2 µl MgCl₂ (25 mM)
-1,0 µl Enzymlösung
-0,5 µl GSP 1 (10 µM)
-0,5 µl GSP 2 (10 µM)

Die PCR wurden als „touch down“-PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C - 10 min
95 °C - 10 s }
68 °C - 5 s } 45 Zyklen, pro Zyklus um 1 °C herunterreguliert bis auf 60 °C
72 °C - 10 s }

Die Fluoreszenz wurde bei 72 °C am Ende jedes Zyklus gemessen. Im Abschluss an jede PCR wurde eine Schmelzkurve aufgenommen, anhand derer die Spezifität der während der PCR entstandenen Produkte überprüft wurde. Gestartet wurde bei 65 °C für 15 Sekunden und die Temperatur wurde langsam auf 95 °C erhöht. Die Geschwindigkeit der Erhitzung betrug 0,1 °C/s, wobei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wurde. Mittels zuvor erstellter Standardkurven für die jeweiligen Gene war es möglich, die relative mRNA-Expression durch Division mit dem entsprechenden GAPDH-Transkriptionslevel zu errechnen.

2.6 Darstellung der Ergebnisse

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit abgebildeten Diagramme zu den Experimenten mit den eukaryotischen Zellen stellen, soweit nicht anders erwähnt, repräsentative Beispiele von mehrfach durchgeführten unabhängigen Versuchen dar, die vergleichbare Resultate aufwiesen. Versuche, die in Wiederholungen abweichende bzw. keine eindeutigen Resultate lieferten, fanden in dieser Arbeit keine Berücksichtigung.

Die angegebenen Messwerte entsprechen, soweit nicht anders angegeben, den Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. Die Standardabweichungen der Messungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Überexpressionsstudien mit NOD2 im HEK293-Modell

Der intrazelluläre Rezeptor NOD2 wird als genereller Sensor von Peptidoglykan-Fragmenten, insbesondere von Muramyl Dipeptid (MDP) angesehen (Girardin et al. 2003a). Voruntersuchungen ergaben, dass die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 das NOD2-Protein nicht in einer ausreichenden und somit durch PCR nachweisbaren Menge zu exprimieren scheint. Deshalb wurden HEK293-Zellen als Modell gewählt, um die Bedeutung von NOD2 durch Überexpressionsversuche mit NOD2-Plasmiden zu untersuchen.

Für die Expressionsversuche wurden NOD2-kodierende Plasmide hergestellt (2.3.3). Um zu bestätigen, dass die Transfektion von HEK293-Zellen mit dem NOD2-Plasmid zu einer NOD2-Proteinexpression führt, wurde ein Westernblot (2.4.3.2) durchgeführt. Zudem wurden die HEK293-Zellen parallel mit einem NOD2-3020InsC-Mutationsplasmid transfiziert. Das durch eine Leserastermutation veränderte NOD2-3020InsC-Protein weist ein geringeres Molekulargewicht auf, was auf die Einführung eines Stop-Codons zurückzuführen ist. Diese 3020InsC Mutation, die für ein MDP nicht erkennendes verkürztes NOD2-Protein codiert, wird mit der entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn assoziiert (Girardin et al. 2003a). Das verkürzte NOD2-3020InsC-Protein besitzt 1007 Aminosäuren anstelle von 1040 Aminosäuren beim Wildtyp-Protein (Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001a).

In Abbildung 3 ist aufgezeigt, dass HEK293-Zellen, die mit NOD2 oder der Mutante von NOD2 (3020InsC) transfiziert wurden, im NOD2-Westernblot ein signifikantes Signal aufwiesen (Spur 1 und 2). Im Gegensatz dazu wies die Kontrolle wie erwartet (leerer Vektor, Spur 3) kein Signal auf. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Transfektion mit dem NOD2-Konstrukten zu einer NOD2-Proteinexpression führt (siehe Abb. 3).

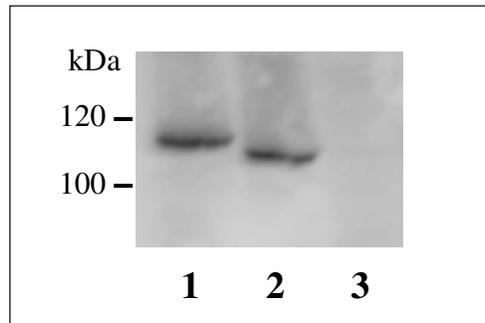


Abb. 3: Überexpression von NOD2 in HEK293-Zellen. NOD2-Westernblot-Analyse von HEK293-Zellen, die mit einem NOD2-Expressionsvektor (Spur 1), einem NOD2-3020InsC-Expressionsvektor (Spur 2) oder leeren Vektor (Spur 3) transfiziert wurden. Es wurden 30 µg Zellextrakt-Auftragspuffergemisch für die Gelelektrophorese verwendet.

MDP (auch als MDP-LD bezeichnet) gilt als natürlicher Agonist für die Aktivierung von NOD2. Die Stimulation von NOD2-überexprimierenden HEK293-Zellen mit MDP aktivierten dabei den Transkriptionsfaktor NF-κB (Girardin et al. 2003a). Um die Funktionalität des NOD2-Plasmid-Konstrukts durch ein Kontrollexperiment nachzuweisen, wurde dieses Konstrukt transient in HEK293-Zellen transfiziert und die NF-κB-Aktivierung nach MDP-Behandlung mit Hilfe eines NF-κB-Luziferaseassays analysiert. Wie Abbildung 4 zeigt, aktiviert die Stimulation von NOD2-transfizierten HEK293-Zellen mit MDP den Transkriptionsfaktor NF-κB. Demgegenüber weisen HEK293-Zellen, die mit der NOD2-Mutante 3020InsC transfiziert wurden, keine Aktivierung von NF-κB nach MDP-Stimulation auf (Abb. 4). HEK293-Zellen, die mit einem leeren Kontrollvektor transfiziert wurden, zeigten keine NF-κB-Aktivierung nach MDP-Behandlung (Abb. 4). Der Grund dafür könnte sein, dass HEK293-Zellen nur eine geringe Menge oder gar kein endogenes NOD2 exprimieren, welches schon nicht in der Westernblot-Analyse detektierbar war (Abb. 3, Spur 3). Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten überein (Girardin et al. 2003a) und zeigen damit die Funktionalität des Wildtyp-Proteins NOD2 sowie des mutierten NOD2-3020InsC-Proteins.

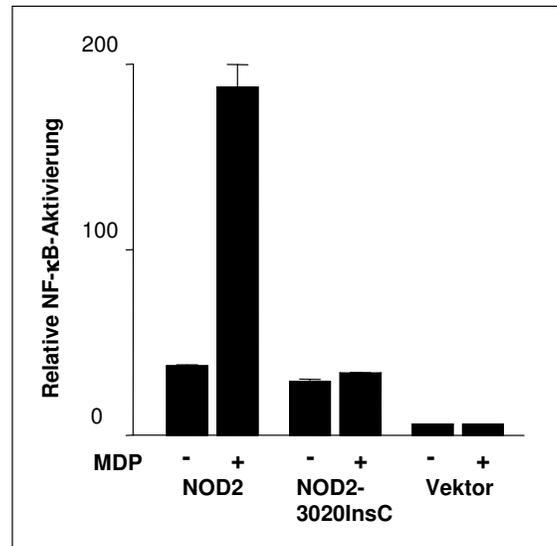


Abb. 4: Funktionelle Überexpression von NOD2 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit dem NOD2 oder NOD2-3020InsC-Expressionsvektor in An- oder Abwesenheit von 1 μ g MDP transfiziert. Nach 24 h wurde die relative NF- κ B-Aktivierung mittels NF- κ B-Luziferaseassay bestimmt.

3.1.1 MDP aktiviert den hBD-2-Promotor über NOD2

HEK293-Zellen wurden mit einem NOD2-Expressionsplasmid und einem hBD-2-Luziferasevektor, der 2338 bp des hBD-2-Promotors enthält, ko-transfiziert, um den Einfluss von NOD2 auf die Aktivierung des hBD-2-Promotors zu untersuchen. Die Transfektion der HEK293-Zellen mit dem NOD2-Expressionsplasmid sowie dem NOD2-3020InsC-Expressionsplasmid führte zu einer Aktivierung des hBD-2-Promotors (Abb. 5). Zellen, die NOD2 überexprimieren, reagieren auf die Behandlung mit MDP mit einer gesteigerten Aktivierung des hBD-2-Promotors. Die mit einem Kontrollvektor transfizierten HEK293-Zellen zeigen keine signifikante Aktivierung des hBD-2-Promotors. HEK293-Zellen, die mit dem NOD2-3020InsC-Expressionsplasmid transfiziert wurden, wiesen ebenfalls keine erhöhte Aktivierung des hBD-2-Promotors durch MDP-Behandlung auf (Abb. 5).

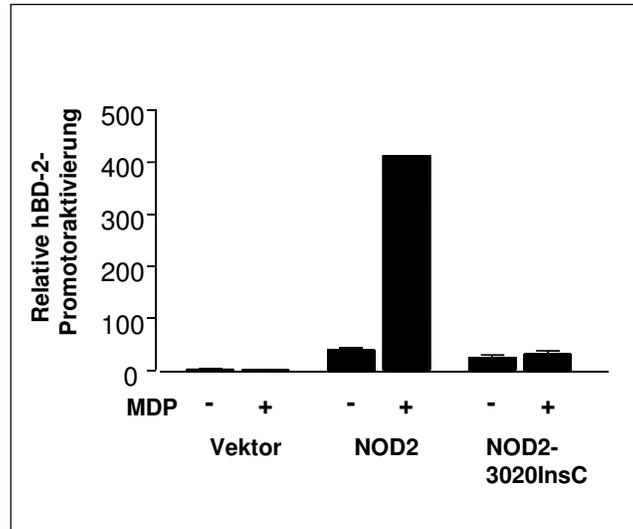


Abb. 5: Relative hBD-2-Promotoraktivierung in Gegenwart von NOD2 und MDP. HEK293-Zellen wurden mit einem hBD-2-Promotor-Luziferaseplasmid und dem NOD2-, NOD2-3020InsC-Expressionsvektor oder dem Kontrollvektor mit oder ohne 1 μ g MDP kotransfiziert. Die relative hBD-2-Promotoraktivierung wurde nach 24 h durch die Messung der Luziferaseaktivität bestimmt.

3.1.2 Eine MDP-Konzentrationssteigerung resultiert in einer Verstärkung der hBD-2-Promotoraktivierung über NOD2

Um zu untersuchen, ob der hBD-2-Promotor dosisabhängig durch MDP über NOD2 aktiviert wird, wurden die NOD2-überexprimierenden HEK293 Zellen mit zunehmenden MDP-Konzentrationen stimuliert. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, kommt es bei einer MDP-Konzentration von 0,5 μ g zu einer 3,4-fachen, bei 1,0 μ g zu einer 6,8-fachen und bei 2 μ g zu einer 11,4-fachen hBD-2-Promotoraktivierung. Somit zeigte sich ein linearer Anstieg der hBD-2-Promotoraktivierung mit zunehmender MDP-Konzentration.

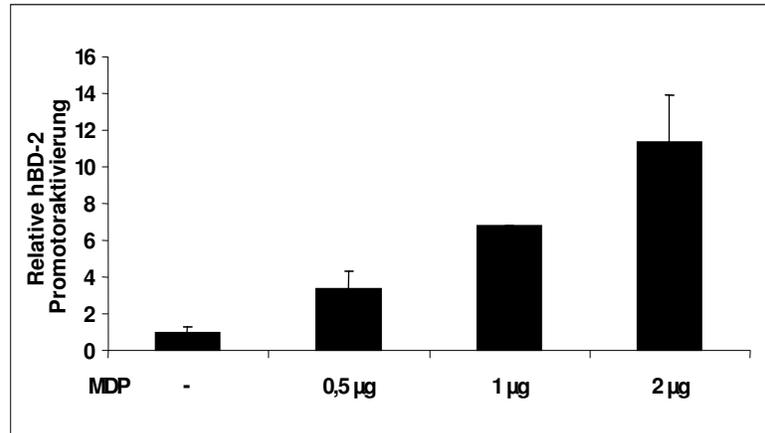


Abb. 6: MDP-Stimulation NOD2-transfizierter HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit dem hBD-2-Promotor-Luziferaseplasmid und dem NOD2-Expressionsvektor ohne oder mit 0,5 µg, 1 µg oder 2 µg MDP ko-transfiziert. Die relative hBD-2-Promotoraktivierung wurde nach 24 h durch die Messung der Luziferaseaktivität bestimmt.

3.1.3 Die hBD-2-Promotoraktivierung ist unabhängig von der Konzentration des NOD2-Expressionsvektors

Um zu ermitteln, ob eine Erhöhung der Konzentration des NOD2-Expressionsvektors zu einer verstärkten NOD2-vermittelten Aktivierung des hBD-2-Promotors bei gleichbleibender MDP-Konzentration führt, wurde ein Versuchsansatz mit unterschiedlichen Konzentrationen des NOD2-Vektors in HEK293-Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer NOD2-Konzentration von 10 ng oder 100 ng kein signifikanter Unterschied bei der Aktivierung des hBD-2-Promotors auftritt (Abb. 7).

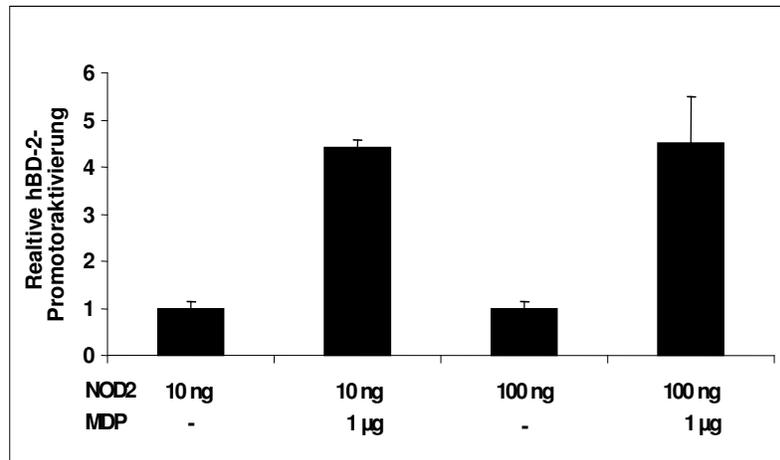


Abb. 7: Konzentrationsreihe des NOD2-Expressionsvektors in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit einem hBD-2-Promotor-Luziferaseplasmid und mit 10 ng bzw. 100 ng Expressionsvektor ohne oder mit 1 µg MDP ko-transfiziert. Die hBD-2-Promotoraktivierung wurde nach 24 h durch die Messung der Luziferaseaktivität bestimmt.

3.1.4 Einfluss der NF-κB-Regulation bei der NOD2-vermittelten hBD-2-Induktion

Die Promotor-Region von hBD-2 beinhaltet putative Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1. Anhand von hBD-2-Promotor-Luziferaseplasmiden, die Mutationen der zwei NF-κB-Bindungsstellen (Position –205 bis –186 und –596 bis –572) und der AP-1-Bindungsstelle (Position –127 bis –121) besitzen, sollte der Einfluss auf die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion untersucht werden (siehe Abb. 9). Diese Konstrukte wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Jürgen Harder zu Verfügung gestellt.

NOD2-überexprimierende HEK293-Zellen wurden mit den in Abbildung 8 schematisch dargestellten hBD-2-Promotorkonstrukten transfiziert, mit MDP stimuliert und die hBD-2-Promotoraktivierung mittels Luziferasemessung analysiert. Die Mutation beider NF-κB-Bindungsstellen und der AP-1-Bindungsstelle zeigen keine NOD2-vermittelte hBD-2-Promotoraktivierung nach MDP-Stimulation. Sowohl die Mutation der zwei NF-κB-Bindungsstellen, als auch die Mutation nur der proximalen NF-κB-Bindungsstelle (–205 bis –186) inhibieren die hBD-2-Promotoraktivierung nahezu vollständig. Im Gegensatz dazu hatte die Mutation der NF-κB-Bindungsstelle an Position –596 bis –572 kaum einen Effekt auf die Blockierung der

hBD-2-Promotoraktivierung. Die Mutation der AP-1-Bindungsstelle reduziert die hBD-2-Promotoraktivierung von 7-fach auf 5-fach (Abb. 9).

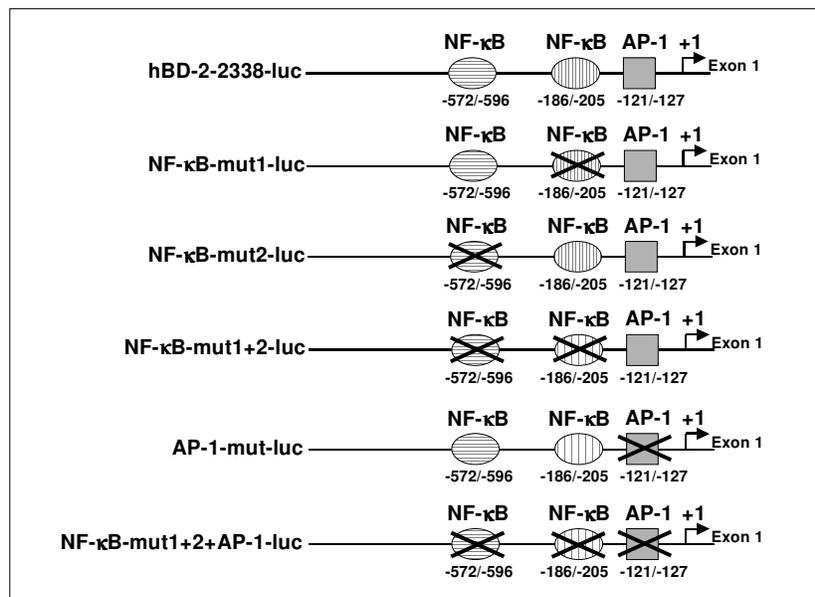


Abb. 8: HBD-2-Promotorkonstrukte. Die dargestellten hBD-2-pGL3-Promotorkonstrukte wurden verwendet. Die Positionen der Nukleotide wurden relativ zum hBD-2-Transkriptionsstart markiert. Zwei NF- κ B-Bindungsstellen und eine AP-1-Bindungsstelle im hBD-2-Promotor (-2338 bis -1 bp), der vor ein Luziferasegen kloniert wurde, wurden in verschiedenen Kombinationen mutiert. Benennung der Konstrukte: NF- κ B-mut1-luc (eine mutierte NF- κ B-Bindungsstelle an Position -205 bis -186), NF- κ B-mut2-luc (eine mutierte NF- κ B-Bindungsstelle an Position -596 bis -572), NF- κ B-mut1+2-luc (zwei mutierte NF- κ B-Bindungsstellen), AP1-mut-luc (eine mutierte AP-1-Bindungsstelle) und AP-1+NF- κ B-mut-luc (zwei mutierte NF- κ B-Bindungsstellen und eine AP-1-Bindungsstelle).

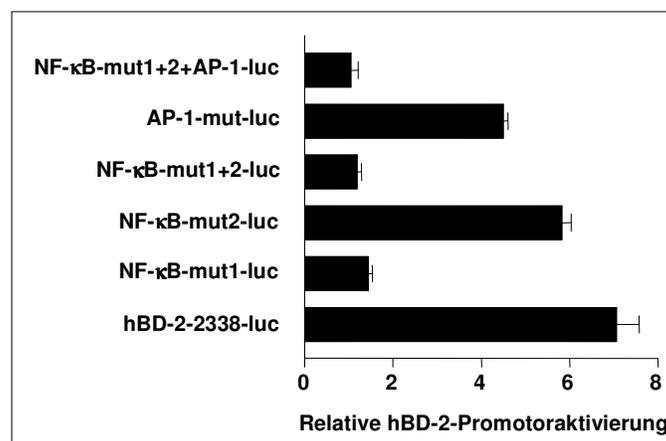


Abb. 9: NOD2-vermittelte hBD-2-Promotoraktivierung in Abhängigkeit funktioneller NF- κ B- und AP-1-Bindungsstellen. HEK293-Epithelzellen wurden mit dem Wildtyp-(hBD-2-2338-luc) oder den mutierten hBD-2-Promotor-Luziferaseplasmiden und zusammen mit dem NOD2-Expressionsvektor sowie 1 μ g MDP ko-transfiziert. Die Induktion des hBD-2-Promotors wurde durch Messung der Luziferaseaktivität ermittelt.

3.1.5 Hemmung der NOD2-vermittelten hBD-2-Induktion

Es ist bekannt, dass eine mutierte Form von I κ B (Traenckner et al. 1995) und der natürliche Entzündungshemmer Helenalin (Lyss et al. 1997; Lyss et al. 1998) einen inhibitorischen Effekt auf die NF- κ B Aktivierung aufweisen. In den folgenden Experimenten wurde eine Beteiligung von NF- κ B auf die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion nach MDP-Stimulation in HEK293-Zellen untersucht.

Um die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der NOD2-vermittelten hBD-2-Promotoraktivierung zu bestätigen, wurde der bekannte Inhibierungseffekt auf NF- κ B sowohl via Vorinkubation für 1 h mit Helenalin (Lyss et al. 1997; Lyss et al. 1998) als auch durch die Überexpression mit der mutierten Form von I κ B (Traenckner et al. 1995) untersucht (siehe 3.1.5.1 und 3.1.5.2).

3.1.5.1 Die Mutante von I κ B hemmt die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion

In der für dieses Experiment verwendeten Super-Repressor Form von I κ B (CMV-I κ B-DN) verhindern zwei Punktmutationen (Ser-32 \rightarrow Ala, Ser-36 \rightarrow Ala) die Phosphorylierung und die spätere proteosomale Degradation von I κ B (Traenckner et al. 1995). Als Konsequenz daraus wird die NF- κ B Aktivierung, die nukleare Translokation und die funktionelle Bindung an DNA verhindert.

Es sollte untersucht werden, inwiefern die Aktivierung von NF- κ B in die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion durch MDP involviert ist. Deshalb wurden HEK293-Zellen vor der Transfektion mit dem NOD2-Überexpressionsplasmid sowie dem hBD-2-Promotor-Luziferaseplasmid und vor der Stimulation mit MDP mit einem Plasmid, das für eine Super-Repressor Form von I κ B codiert, transfiziert.

NOD2-transfizierte HEK293-Zellen, die mit einem leeren CMV-Vektor transfiziert wurden, zeigten bei Stimulation mit MDP eine 29-fache hBD-2-Promotoraktivierung. Wurde der Super-Repressor I κ B in HEK293-Zellen ko-exprimiert, reduzierte sich die relative hBD-2-Promotoraktivierung nach MDP-Stimulierung auf ein 2-faches (Abb. 10).

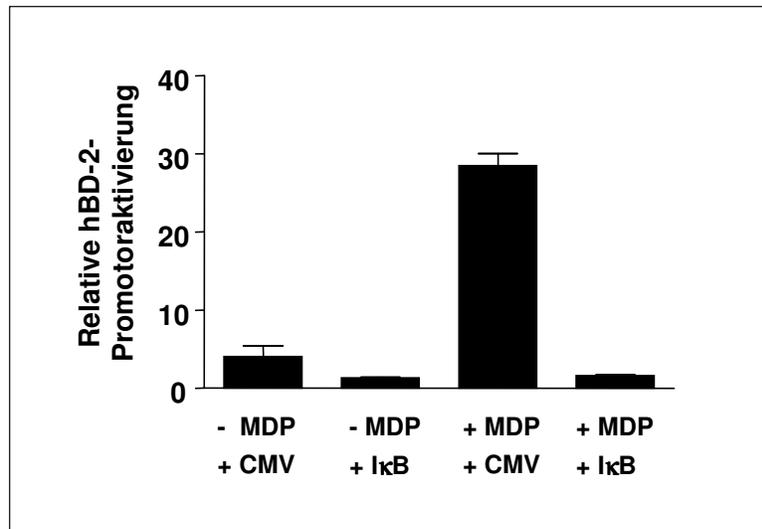


Abb. 10: NOD2-vermittelte hBD-2-Promotoraktivierung in Abhängigkeit von der Transfektion mit IκB. HEK293-Zellen wurden transient mit einem Plasmid, das die Überexpression der Super-Repressor Form des NF-κB-Inhibitors IκB erlaubt (CMV-IκB-DN) oder mit dem leeren Vektor (CMV) transfiziert. Nach 16 h wurden die Zellen mit einem NOD2-Überexpressionsplasmid sowie einem hBD-2-Promotor-Luziferaseplasmid mit oder ohne 1 µg MDP ko-transfiziert. 24 h später wurden die Zellen geerntet und die hBD-2-Promotoraktivierung über die Luziferaseaktivität quantifiziert.

3.1.5.2 Helenalin reduziert die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion

Das Sesquiterpen-Lacton Helenalin ist ein natürlicher Entzündungshemmer, der in der Arnikapflanze vorkommt. Helenalin hemmt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, wobei der molekulare Mechanismus der Hemmung noch nicht ganz aufgeklärt werden konnte (Lyss et al. 1997; Lyss et al. 1998).

Die NF-κB-Aktivierung wurde in HEK293-Zellen durch den spezifischen Inhibitor Helenalin blockiert, um den Einfluss von NF-κB auf die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion durch Stimulation mit MDP weiter zu untersuchen. Wie in Abbildung 11 dargestellt, konnte die MDP-vermittelte Induktion des hBD-2-Promotoraktivierung in NOD2-überexprimierenden HEK293-Zellen durch die einstündige Vorinkubation der Zellen mit Helenalin von einer 7-fachen auf eine 2,5-fache reduziert werden.

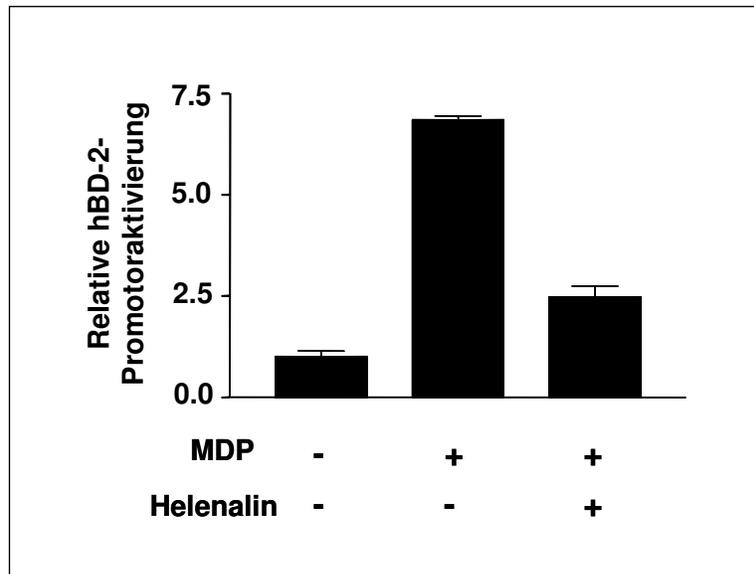


Abb. 11: NOD2-vermittelte relative hBD-2-Promotoraktivierung nach Inkubation mit Helenalin. Die HEK293-Zellen wurden 1 h mit Helenalin (4 μ M) vorinkubiert. Anschließend wurden sie transient mit dem NOD2-überexprimierenden Plasmid und einem hBD-2-Promotor-Luziferaseplasmid mit oder ohne 1 μ g MDP ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, und die hBD-2-Promotoraktivierung wurde durch Messung der Luziferaseaktivität bestimmt.

3.2 NOD2-Expression in verschiedenen Geweben

In den folgenden Experimenten wurden die aus den Untersuchungen mit dem HEK293-Modell erworbenen Erkenntnisse umgesetzt. Es sollte zunächst untersucht werden, in welchen unterschiedlichen humanen Geweben NOD2 exprimiert wird. Weiterhin war von Interesse, ob in den Geweben, die NOD2 exprimieren, die Aktivierung des intrazellulären Rezeptors NOD2 zur Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 führen würde.

3.2.1 NOD2-mRNA wird in verschiedenen Geweben exprimiert

Um zu analysieren, in welchen Geweben mRNA für NOD2 exprimiert wird, wurde eine Reverse Transkriptase-(RT)-PCR mit den Intron-überspannenden Primern NOD2-f1 und NOD2-r3 (siehe Tabelle 1) durchgeführt. Eine Vielzahl von Geweben, außer der Leber, exprimieren NOD2, darunter Haut, Dünndarm und primäre Keratinozyten (Abb. 12).

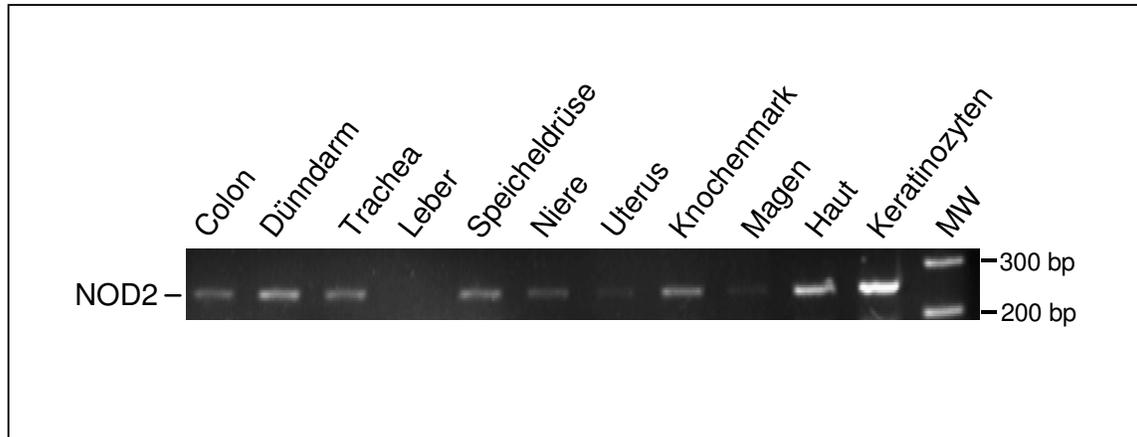


Abb. 12: NOD2-mRNA-Expression in verschiedenen humanen Geweben. Die zur Verfügung gestellte cDNA wurde aus verschiedenen Geweben hergestellt. Die NOD2-Genexpression wurde durch RT-PCR analysiert (MW = „molecular weight size marker“).

Da diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass NOD2 in der Haut exprimiert wird, wurde im folgenden Abschnitt die *in vivo* Expression von NOD2 in der Haut mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht.

3.2.2 *In vivo* Expression von NOD2 in der Haut

Aufgrund der hohen Expression von NOD2-mRNA in primären Keratinozyten und in der Haut (3.2.1) wurde die *in vivo* Expression von NOD2 mittels immunhistochemischer Färbung (2.4.5) von Paraffinschnitten aus Normalhaut untersucht. In Abbildung 13 sind die mit einem NOD2-Antikörper angefärbten Gewebeschnitte sowie dazugehörige Kontrollen ohne Behandlung mit Primärantikörper dargestellt. Hierbei wurde eine deutliche NOD2-Expression in der Epidermis, vor allem in den äußeren Schichten, dem *Stratum corneum* und dem *Stratum granulosum*, sowie in talgproduzierenden Zellen, den sogenannten Sebozyten, detektiert. Die als Kontrolle dienenden Paraffinschnitte, die nicht mit NOD2-Antikörpern behandelt wurden, wiesen keine Färbung in diesen Bereichen auf.

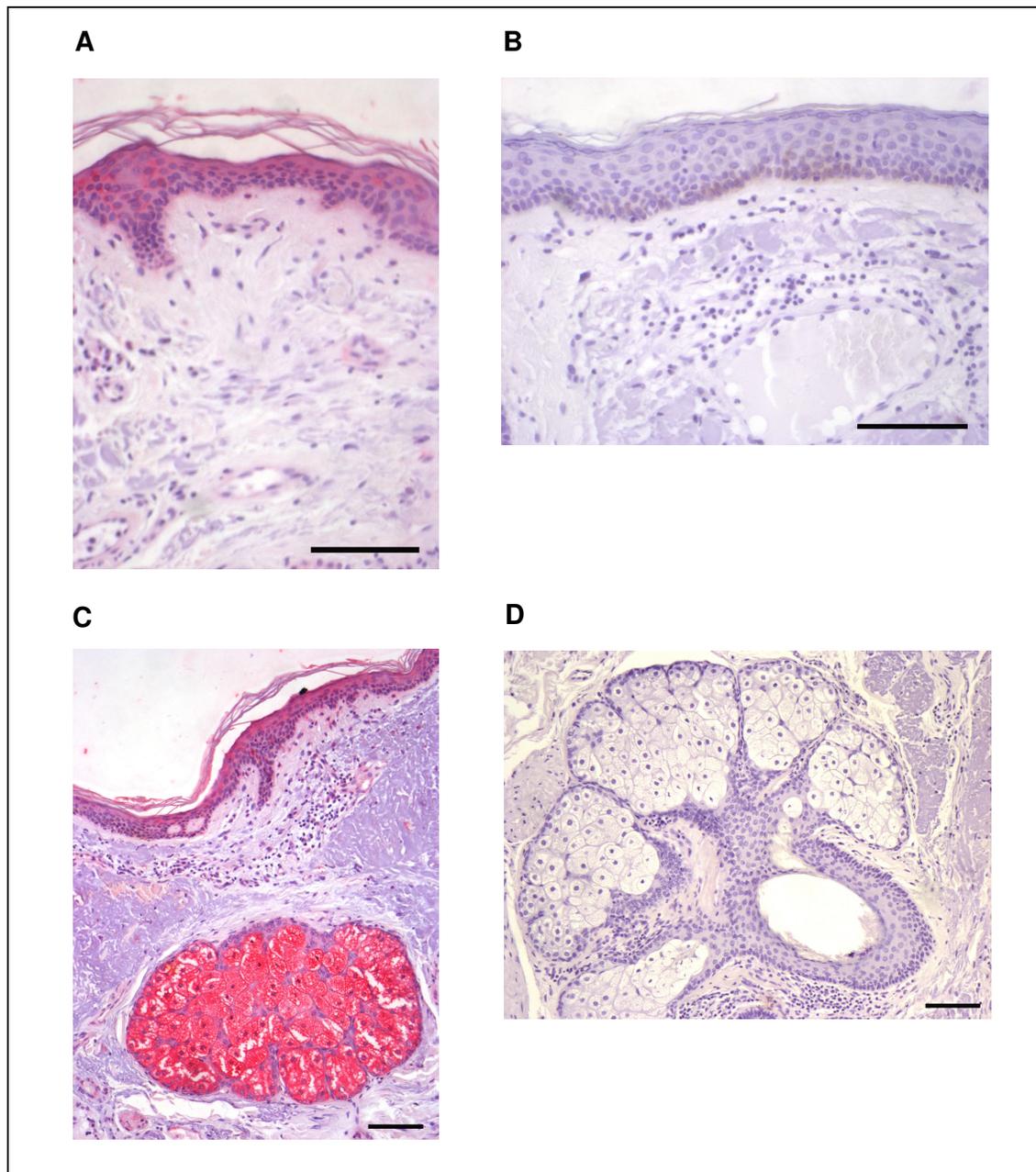


Abb. 13: Immunreaktivität von NOD2 in gesunder Haut. Gezeigt ist eine immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten von normaler humaner Haut. A und C: Mit NOD2-Antikörper behandelte Paraffinschnitte von normaler humaner Haut, B und D: Paraffinschnitte, die nicht mit Primärantikörper behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Deutlich erkennbar ist eine Anfärbung der Epidermis (A) sowie eine starke Anfärbung von Sebozyten (C). Die Kontrollen zeigen keine spezifische Anfärbung von Epidermis oder Sebozyten (B und D). Der eingezeichnete Maßstab entspricht 100 μm .

3.3 Expression von NOD2 in primären Keratinozyten

Wie die Daten in 3.1.4 zeigen, spielt NF- κ B eine Rolle bei der Regulation der NOD2-vermittelten hBD-2-Induktion in HEK293-Zellen. Es wurde zudem beschrieben, dass NF- κ B die Induktion von hBD-2 in Keratinozyten vermittelt (Wehkamp et al. 2004a). In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Aktivierung des intrazellulären Rezeptors NOD2 durch MDP zu einer Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in primären Keratinozyten führt.

3.3.1 NOD2-Proteinexpression

In Abschnitt 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass unter anderem Keratinozyten NOD2-mRNA exprimieren. Durch eine Westernblot-Analyse sollte nun nachgewiesen werden, dass es in primären Keratinozyten (isoliert aus infantilen Vorhäuten, siehe Abschnitt 2.2.4) zur Expression von NOD2-Proteinen kommt. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, exprimieren primäre Keratinozyten NOD2-Proteine.

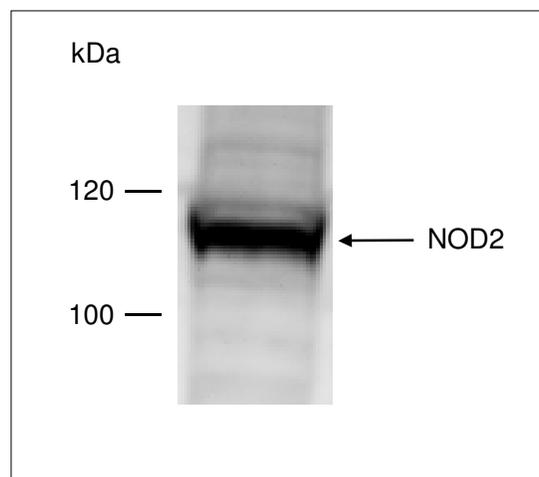


Abb. 14: Westernblot-Analyse primärer Keratinozyten. Die NOD2-Proteinexpression in primären Keratinozyten wurde durch Immunpräzipitation und anschließender Westernblot-Analyse mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

3.3.2 MDP-induzierte hBD-2-Proteinexpression

Um nachzuweisen, dass NOD2 die hBD-2-Proteinexpression in primären Keratinozyten vermittelt, wurden diese Zellen mit unterschiedlichen MDP-Konzentrationen stimuliert. Wie sich in Vorversuchen herausstellte, wurde MDP durch das Transfektionsreagenz ProteoJuice am effektivsten in primäre Keratinozyten gebracht, weshalb das bei den HEK293-Zellen benutzte Transfektionsreagenz Fugene 6 nicht verwendet wurde. Die Kulturüberstände der Keratinozyten wurden mittels ELISA-Analysen auf sezerniertes hBD-2 untersucht. Es zeigte sich ein linearer Anstieg der hBD-2-Proteinexpression bei zunehmender MDP-Konzentration (siehe Abb. 15), ähnlich wie für die HEK293-Zellen (Abschnitt 1.1.2) gezeigt wurde.

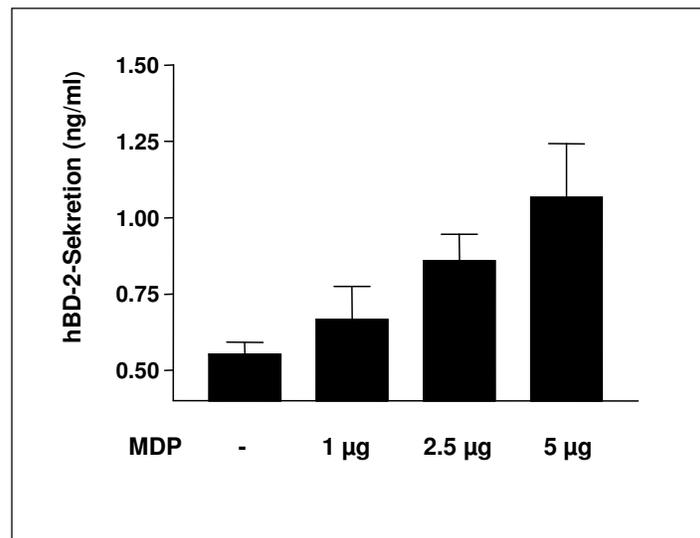


Abb. 15: MDP-induzierte hBD-2-Sekretion in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 2,5 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an MDP behandelt. Anschließend wurde das Medium verworfen, und die Zellen wurden weitere 7 h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden durch eine ELISA-Analyse auf die Anwesenheit von hBD-2-Proteinen getestet.

3.3.3 Induktion der NOD2-Expression durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen

Primäre Keratinozyten wurden mit IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (20 ng/ml) für 24 h stimuliert. Die Analyse durch „Realtime“-PCR zeigt, dass die relative NOD2-mRNA-Expression in primären Keratinozyten bei Stimulation mit IL-1 β eine 4,8-fach höhere

relative NOD2-mRNA-Expression im Vergleich zum Kontrollansatz aufweist. Die Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ führen zu einer 4,5- bzw. 9,6-fachen Induktion der relativen NOD2-mRNA-Expression (Abb. 16).

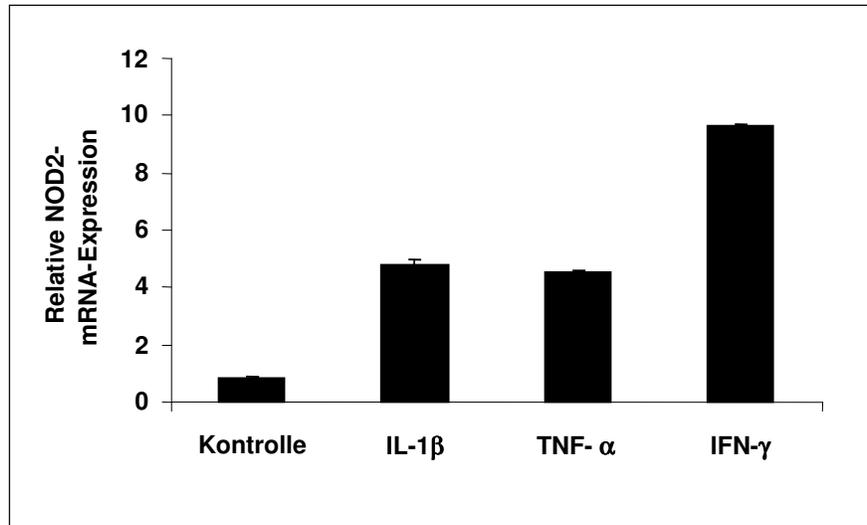


Abb. 16: Relative mRNA-Induktion von NOD2 in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 24 h mit IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (20 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde mittels „Realtime“-PCR-Analyse die relative NOD2-mRNA-Expression gemessen.

3.3.4 Die Stimulation der hBD-2-mRNA-Expression in Keratinozyten durch *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturüberstände wird nicht über NOD2 vermittelt

Pseudomonas aeruginosa-Kulturüberstände (PA) induzieren die hBD-2-Expression in Keratinozyten (Wehkamp et al. 2006b). Um zu überprüfen, ob die hBD-2-Stimulation durch die PA-Kulturüberstände (2.1.4.2) über NOD2 vermittelt wird, wurden primäre Keratinozyten mit dem NOD2-Expressionsplasmid transfiziert und anschließend für 24 h mit PA-Überständen stimuliert. Die relative mRNA-Expression von NOD2 bzw. hBD-2 wurde durch „Realtime“-PCR quantifiziert.

Abbildung 17 zeigt die relative NOD2-mRNA-Expression in NOD2-übertransfizierten primären Keratinozyten. Die Transfektion von primären Keratinozyten mit dem NOD2-Expressionsplasmid führt im Gegensatz zu den Transfektionsansätzen mit dem Kontroll-Plasmid zu einer erwarteten Erhöhung der NOD2-Expression, so dass man von einer funktionierenden Übertransfektion mit dem NOD2-Expressionsplasmid

in primären Keratinozyten ausgehen kann. Primäre Keratinozyten, die mit dem Kontroll-Plasmid übertransfiziert wurden, wiesen eine 4-fache Erhöhung der relativen NOD2-mRNA-Expression nach Stimulation mit PA-Überständen auf.

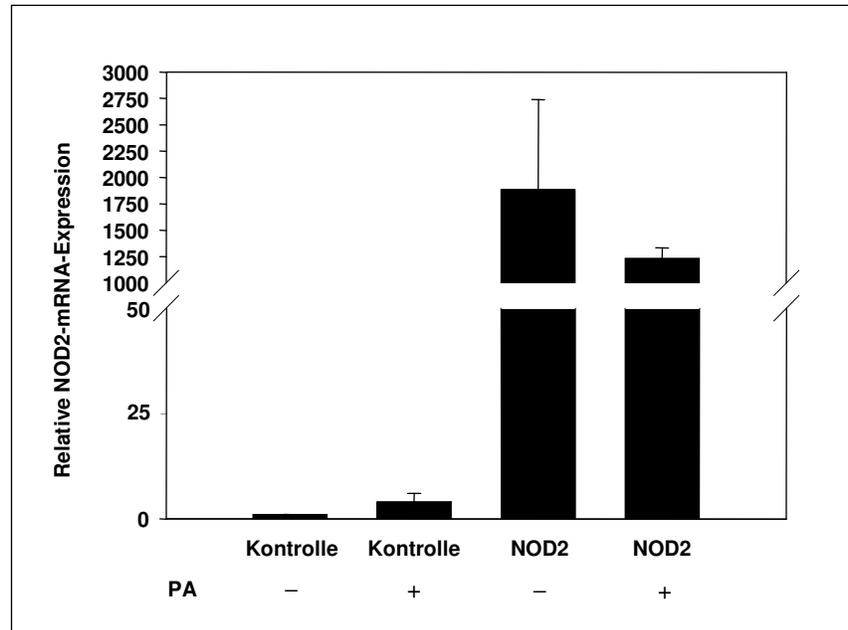


Abb. 17: Relative NOD2-mRNA-Expression in NOD2-übertransfizierten primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 7 h mit einem Kontroll- oder NOD2-Expressionsplasmid transfiziert, das Medium gewechselt und nach insgesamt 26 h mit *Pseudomonas aeruginosa*-Überstand (PA) für weitere 24 h stimuliert. Die relative NOD2-mRNA-Expression wurde mittels „Realtime“-PCR-Analyse quantifiziert.

Abbildung 18 zeigt, dass die Stimulation von NOD2-übertransfizierten primären Keratinozyten mit den hergestellten Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* keine Induktion der hBD-2-mRNA-Expression im Vergleich zu den stimulierten Kontrollansätzen aufweist (Abb. 18). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die PA-vermittelte Stimulation von hBD-2 nicht durch NOD2 beeinflusst wird.

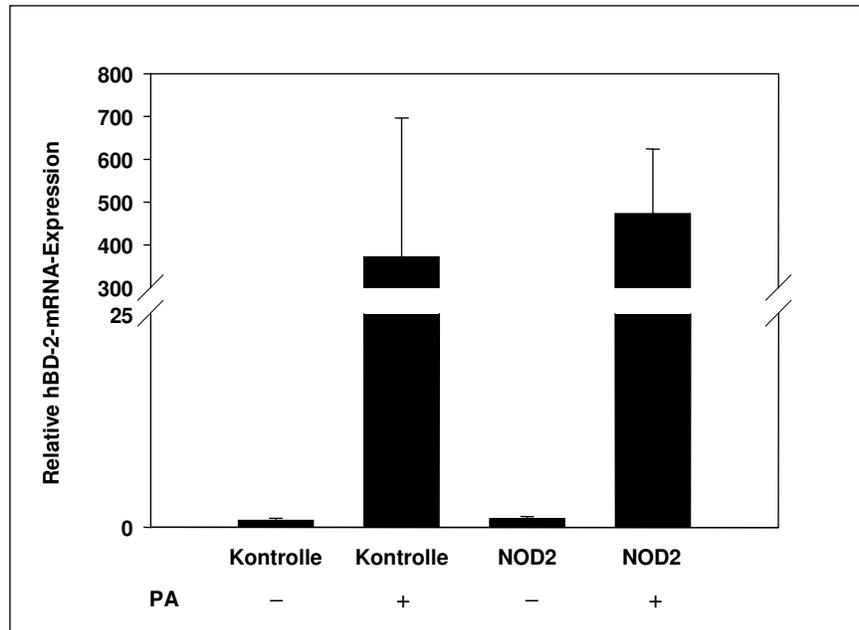


Abb. 18: Relative hBD-2-mRNA-Expression in NOD2-transfizierten primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden für 7 h mit einem Kontroll- oder NOD2-Expressionsplasmid transfiziert, das Medium gewechselt und nach insgesamt 26 h mit *Pseudomonas aeruginosa*-Überstand (PA) für weitere 24 h stimuliert. Die relative hBD-2-mRNA-Expression wurde durch „Realtime“-PCR-Analyse ermittelt.

3.3.5 „Knock-Down“-Experimente an humanen primären Keratinozyten mit „Stealth“-siRNA

Die Verwendung von siRNA hat sich zu einem wichtigen Werkzeug beim spezifischen Ausschalten („knock down“) von Genen in einer Vielzahl von Organismen sowie in menschlichen Zellen entwickelt (Fire et al. 1998).

Um zu überprüfen, dass die Aktivierung von NOD2 durch seinen Liganden MDP die Sekretion von hBD-2 vermittelt, wurde die siRNA-Methode gewählt, die selektiv die Expression von NOD2 in primären Keratinozyten inhibiert.

3.3.5.1 GL3-siRNA inhibiert die NOD2-Expression

Um die Effizienz der siRNA-Methode in primären Keratinozyten zu untersuchen, wurde ein Kontrollexperiment mit einem pGL3-RNase 7-Promotor-Luziferaseplasmid (funktionelle Kontrolle) und einer Luziferase-spezifischen siRNA (GL3-siRNA) durchgeführt. Die Keratinozyten wurden mit dem pGL3-RNase 7-Promotor-

Luziferaseplasmid für 8 h transfiziert und nach insgesamt 24 h mit der Luziferase GL3-siRNA mittels Lipofectamine 2000 für weitere 24 h transfiziert.

Die Messung der Luziferaseaktivität zeigte, dass eine Transfektion mit der GL3-siRNA in einer etwa 90%igen Inhibition der RNase 7-Promotoraktivierung resultierte (Abb. 19).

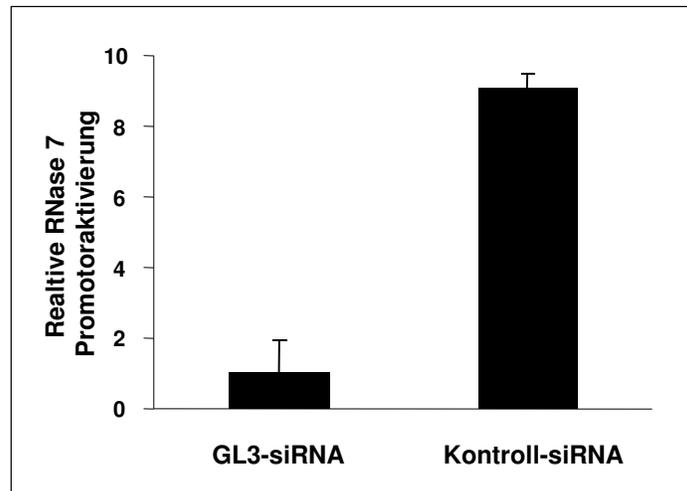


Abb. 19: Transfektion mit GL3-siRNA in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit einem pGL3-RNase 7 Promotor-Luziferaseplasmid für 8 h transfiziert. Nach insgesamt 24 h wurden die Zellen mit Luziferase GL3-siRNA für weitere 24 h transfiziert. Die RNase 7 Promotoraktivierung wurde durch die Messung der Luziferaseaktivität bestimmt.

3.3.5.2 Hemmung der NOD2-Genexpression mit NOD2-spezifischer siRNA

Wird die Sekretion von hBD-2 über die Aktivierung von NOD2 durch MDP in primären Keratinozyten vermittelt, sollte durch Hemmung der NOD2-Genexpression mit NOD2-spezifischer siRNA die Aktivierung von hBD-2 unterdrückt werden. Hierfür wurden primäre Keratinozyten 20 h mit NOD2-spezifischer siRNA (siehe Tabelle 1) oder einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen zusammen mit dem Transfektionsreagenz ProteoJuice und 5 µg/ml MDP oder MDP-LL inkubiert. Die Behandlung mit dem biologisch inaktiven MDP-Isomer MDP-LL diente als Kontrolle (Abb. 20 und 21). Nach 2,5 h wurde das Medium verworfen und die Zellen für weitere 7 h inkubiert.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen, resultiert die Transfektion primärer Keratinozyten mit einer NOD2-spezifischen siRNA in einer deutlichen Reduzierung (ca. 80%) der NOD2-Genexpression.

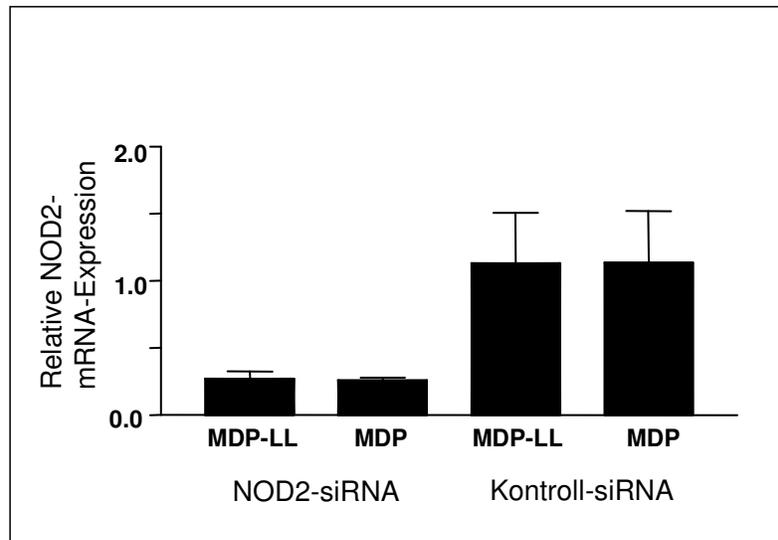


Abb. 20: Transfektion mit NOD2-spezifischer siRNA. Dargestellt ist die relative NOD2-Genexpression, die durch „Realtime“-PCR-Analyse quantifiziert wurde. MDP-LL ist die biologisch inaktive Form von MDP.

Primäre Keratinozyten, die mit NOD2-spezifischer siRNA transfiziert wurden, verlieren die Fähigkeit, hBD-2 nach Stimulation mit MDP auszuschütten (siehe Abb. 21). Im Vergleich dazu reagieren Keratinozyten, die mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden, auf die MDP-Behandlung mit einer Sekretion von hBD-2-Proteinen (Abb. 21). Es resultierte keine signifikante Änderung der hBD-2-Proteinsekretion zwischen MDP- und MDP-LL-behandelten NOD2-siRNA-transfizierten primären Keratinozyten.

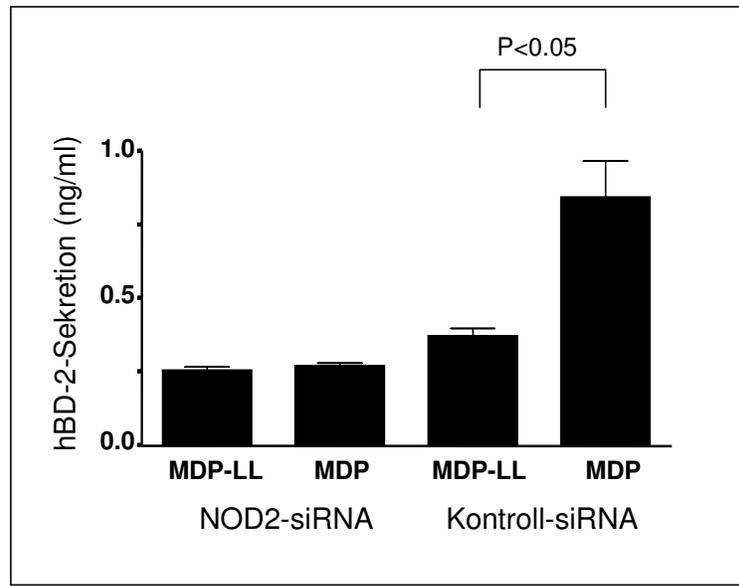


Abb. 21: Transfektion mit NOD2-spezifischer siRNA. Dargestellt ist die hBD-2-Sekretion in den Zellkulturüberständen, die mittels hBD-2-ELISA-Analysen quantifiziert wurde. MDP-LL ist die biologisch inaktive Form von MDP ($p < 0,05$; Student's *t*-test).

Zusammengefasst bestätigen diese Daten, dass die MDP-vermittelte hBD-2-Induktion in primären Keratinozyten funktionelles NOD2 benötigt.

3.4 Die Stimulation mit *Salmonella typhimurium* induziert nicht die NOD2-vermittelte hBD-2-mRNA-Expression in CaCo-2- oder MKN-45-Zellen

Von Hisamatsu et al. wurde 2003 beschrieben, dass NOD2 in intestinalen Epithelzellen und in primären intestinalen Epithelzellen exprimiert wird und hier als antimikrobieller Faktor zu fungieren scheint, da die Anzahl der überlebenden invasiven *Salmonella typhimurium*-Bakterien in NOD2-transfizierten CaCo-2-Zellen geringer als bei den untransfizierten CaCo-2-Zellen war. Im Gegensatz dazu wurden *Salmonella typhimurium*-Bakterien in CaCo-2-Zellen, die mit der NOD2-Mutante 3020InsC transfiziert waren, nicht vermehrt abgetötet (Hisamatsu et al. 2003).

Um zu überprüfen, ob die NOD2-vermittelte hBD-2-Expression in intestinalen Epithelzellen, wie z. B. CaCo-2- und MKN-45-Zellen, durch Stimulation mit *Salmonella typhimurium* induziert werden kann, wurden diese Epithelzellen für 16 h mit einem Kontroll- oder NOD2-Expressionsplasmid transfiziert. Im Anschluss

wurden CaCo-2- und MKN-45-Zellen für 6 h mit *Salmonella typhimurium* (6×10^6 Zellen/ml) inkubiert. Die NOD2-mRNA-Expression wurde durch „Realtime“-PCR-Analysen ermittelt.

Die Transfektion der CaCo-2-Zellen mit dem NOD2-Expressionsplasmid führte im Gegensatz zur Transfektion mit dem Kontroll-Plasmid zu einer erwarteten Erhöhung der NOD2-mRNA-Expression (Abb. 22).

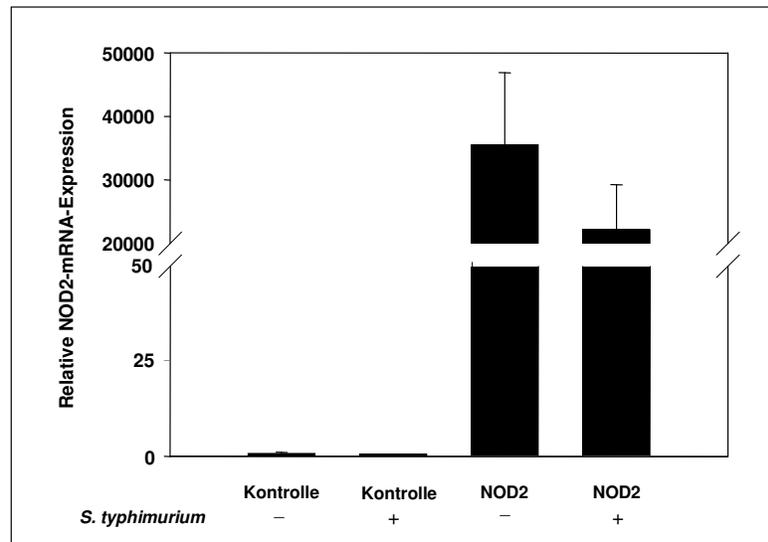


Abb. 22: Relative NOD2-mRNA-Expression in NOD2-übertransfizierten CaCo-2-Zellen. CaCo-2-Zellen wurden für 16 h mit einem Kontroll- oder NOD2-Expressionsplasmid transfiziert und danach für 6 h mit *Salmonella typhimurium* stimuliert. Nach der Stimulation wurde die relative NOD2-mRNA-Expression durch „Realtime“-PCR-Analyse quantifiziert.

In NOD2-transfizierten (263-fach) kam es im Vergleich zu Kontroll-Plasmid-transfizierten (129-fach) CaCo-2-Zellen nach Stimulation mit *Salmonella typhimurium* nicht zu einer Erhöhung der hBD-2-mRNA-Expression. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die hBD-2-mRNA-Expression in NOD2-transfizierten CaCo-2-Zellen um etwa 50% im Vergleich zu Kontroll-Plasmid-transfizierten (129-fach) CaCo-2-Zellen reduziert (Abb. 23).

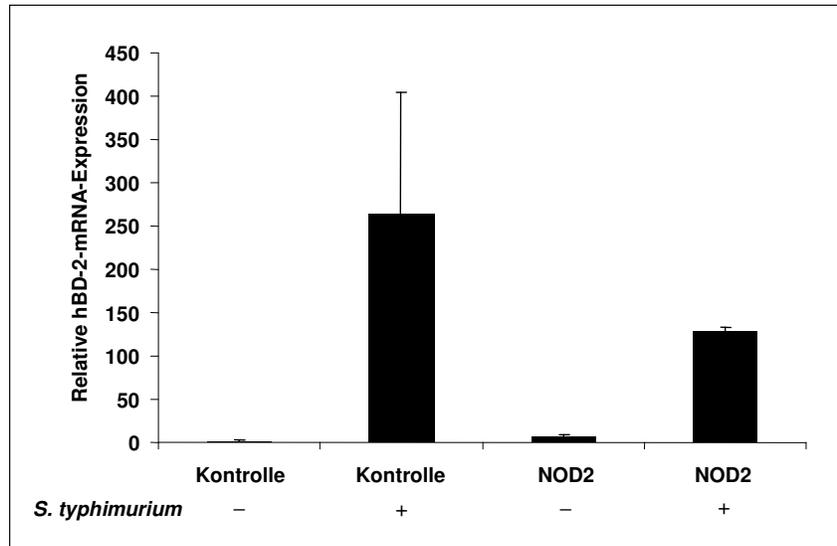


Abb. 23: Relative hBD-2-mRNA-Expression in NOD2-übertransfizierten CaCo-2-Zellen. CaCo-2-Zellen wurden für 16 h mit einem Kontroll- oder NOD2-Expressionsplasmid transfiziert und danach für 6 h mit *Salmonella typhimurium* stimuliert. Nach der Stimulation wurde die relative hBD-2-mRNA-Expression mittels „Realtime“-PCR-Analyse ermittelt.

Ähnlich wie bei den CaCo-2-Zellen (siehe oben) führte die Transfektion von MKN-45-Zellen mit dem NOD2-Expressionsplasmid zu einer Erhöhung der NOD2-mRNA-Expression. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen *Salmonella typhimurium*-stimulierten oder unstimulierten Ansätzen bezüglich der NOD2-mRNA-Expression (Abb. 24).

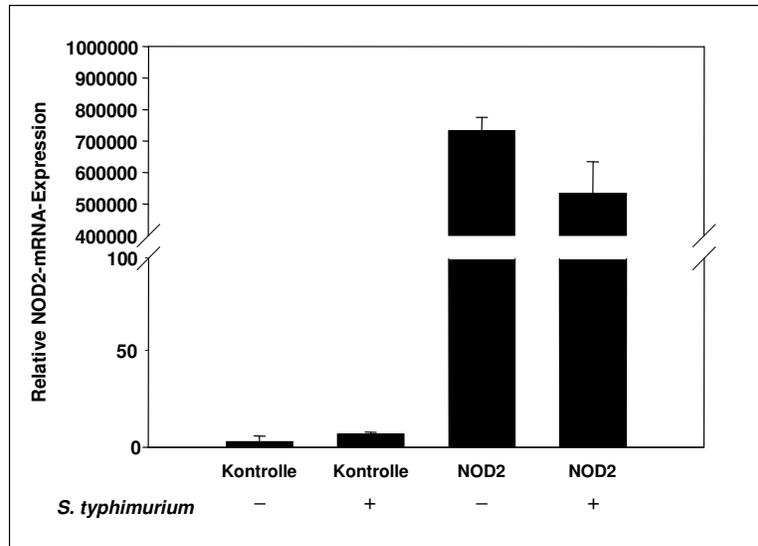


Abb. 24: Relative NOD2-mRNA-Expression in NOD2-übertransfizierten MKN-45-Zellen. MKN-45-Zellen wurden für 16 h mit einem Kontroll- oder NOD2-Expressionsplasmid transfiziert und danach für 6 h mit *Salmonella typhimurium* stimuliert. Nach der Stimulation wurde die relative NOD2-mRNA-Expression durch „Realtime“-PCR-Analyse quantifiziert.

Bei den MKN-45-Zellen, die mit dem NOD2-Expressionsplasmid oder dem Kontroll-Plasmid transfiziert wurden, kam es nach einer 6-stündigen Stimulation mit *Salmonella typhimurium* zu einer Induktion der hBD-2-mRNA-Expression. In NOD2-transfizierten MKN-45-Zellen (2600-fach) wurde die hBD-2-mRNA-Expression im Vergleich zu Kontroll-Plasmid-transfizierten (2900-fach) nach der Stimulation mit *Salmonella typhimurium* nicht erhöht (Abb. 25).

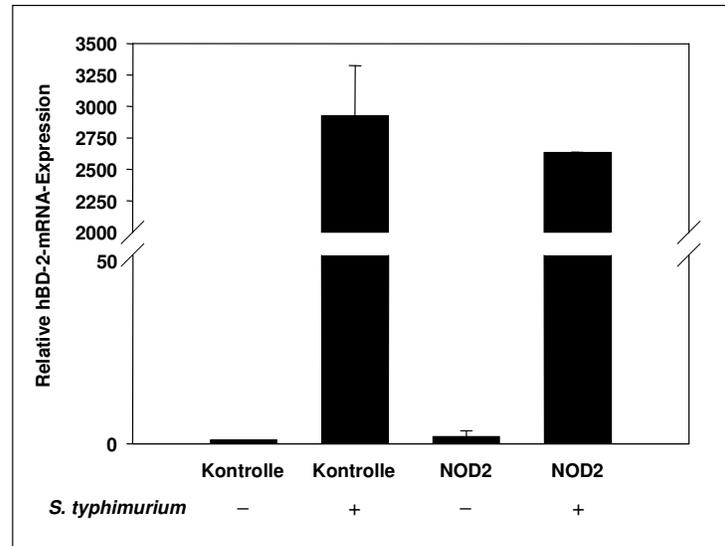


Abb. 25: Relative hBD-2-mRNA-Expression in NOD2-übertransfizierten MKN-45-Zellen. MKN-45-Zellen wurden für 16 h mit einem Kontroll- oder NOD2-Expressionsplasmid transfiziert und danach für 6 h mit *Salmonella typhimurium* stimuliert. Nach der Stimulation wurde die relative hBD-2-mRNA-Expression mittels „Realtime“-PCR-Analyse quantifiziert.

Diese Daten zeigen, dass es zu einer Induktion von hBD-2 durch Stimulation mit *Salmonella typhimurium* in CaCo-2- und MKN-45-Zellen kommt; diese Induktion scheint allerdings NOD2-unabhängig zu sein.

3.5 Expression von verschiedenen NLR-Proteinen in primären Keratinozyten

Um einen Einblick in die Bedeutung von NLR-Proteinen für die angeborene Abwehr der menschlichen Haut zu bekommen, wurde die mRNA-Expression von NLR-Proteinen in primären Keratinozyten durch konventionelle RT-PCR sowie „Realtime“-PCR analysiert. Um zwischen cDNA und kontaminierender genomischer DNA zu unterscheiden, wurden Intron-überspannende Primerpaare generiert (s. Tabelle 1).

Die Genexpression von sieben NLR-Proteinen (von 20 getesteten, siehe Tab. 1) wurde in primären Vorhaut-Keratinozyten durch eine konventionelle RT-PCR detektiert. Darunter waren NALP1, NALP2, NALP10, NOD1, NOD2, NOD9 und NOD27. Die Expression von NOD27 in Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA)-stimulierter cDNA (Spur 14) konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 26).

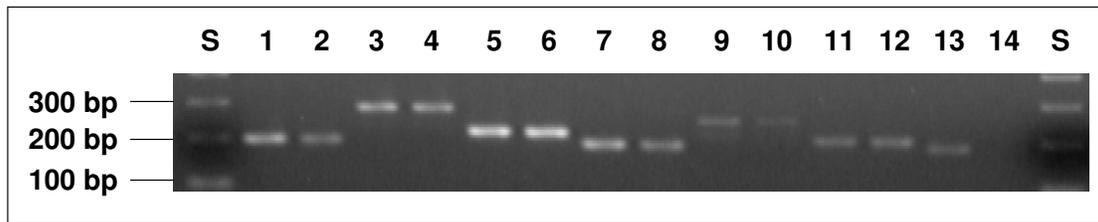


Abb. 26: Die mRNA-Expression verschiedener NLR-Proteine mit cDNA aus primären Keratinozyten nach der Stimulation mit PMA sowie nach der Stimulation mit Überständen von *Pseudomonas aeruginosa*. 1-2 NALP1, 3-4 NALP2, 5-6 NALP10, 7-8 NOD1, 9-10 NOD2, 11-12 NOD9, 13-14 NOD27, S=Standard. Ungerade Zahlen: PCR-Produkte aus der Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*, gerade Zahlen: PCR-Produkte aus der Stimulation mit PMA.

Mit Hilfe von „Realtime“-PCR-Analysen ließ sich eine stark erhöhte Induktion von NALP10 nach Stimulation der primären Keratinozyten mit PMA detektieren (Abb. 27).

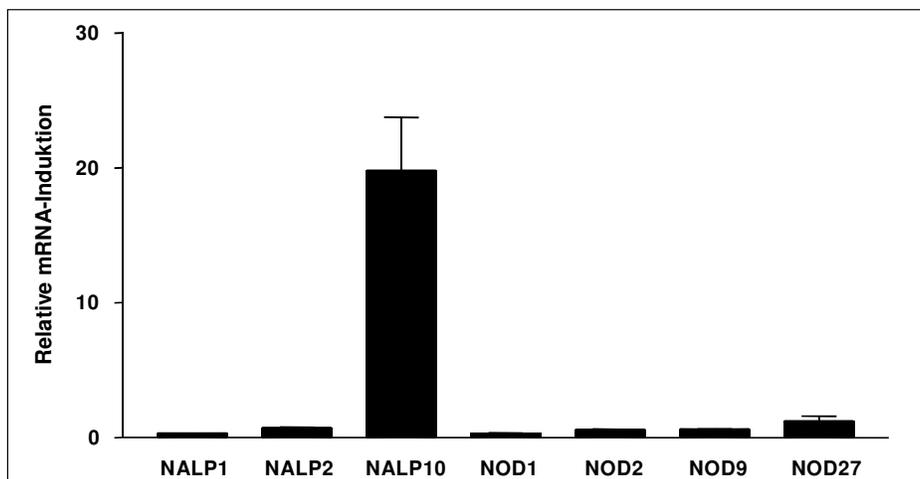


Abb. 27: Induktion von NALP1-, NALP2-, NALP10-, NOD1-, NOD2-, NOD9- und NOD27-mRNA in primären Keratinozyten. Die primären Keratinozyten wurden mit PMA stimuliert. Die relative mRNA-Induktion wurde mittels „Realtime“-PCR-Analyse quantifiziert.

Primäre Keratinozyten, die mit Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert worden waren, zeigten neben einer mäßigen Induktion von NOD2, kaum eine Beeinflussung der Genexpression der untersuchten NLR-Proteine (Abb. 28).

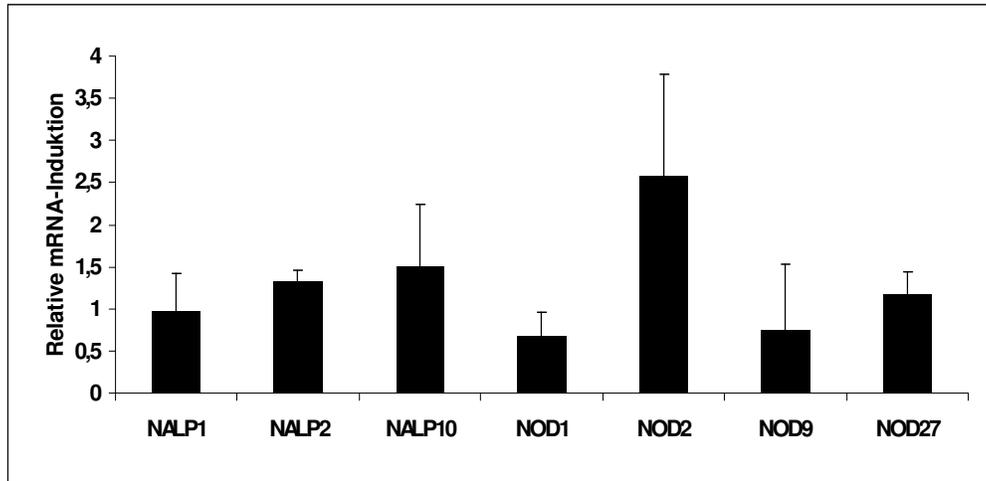


Abb. 28: Relative mRNA-Induktion von NALP1, NALP2, NALP10, NOD1, NOD2, NOD9 und NOD27 in primären Keratinozyten. Die primären Keratinozyten wurden mit Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* behandelt. Die relative Induktion der mRNA wurde mittels „Realtime“-PCR-Analyse quantifiziert.

4. Diskussion

Durch den permanenten Kontakt der menschlichen Haut mit einer großen Anzahl unterschiedlicher potentiell pathogener Mikroorganismen hat diese primär die Funktion, den Organismus gegen infektiöse Keime und toxische Substanzen der Umwelt zu schützen. Zum einen schützt sich die Haut diesbezüglich durch eine intakte physikalische Barriere, zum anderen besitzen Wirbeltiere ein hocheffizientes System zur Abwehr von Infektionen, das auf das Zusammenspiel von humoralen und zellulären Mechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zurückzuführen ist. Die menschliche Haut besitzt zur Erhaltung der natürlichen Integrität auch eine „chemische Barriere“ als Abwehrsystem basierend auf der Produktion verschiedener antimikrobieller Proteine wie z. B. hBD-2, hBD-3, RNase 7, RNase 8 und Psoriasin (Ganz und Lehrer 1998; Schröder 1999b; Harder und Schröder 2002; Zasloff 2002; Boman 2003; Raman und Cobb 2003; Gläser et al. 2005; Rudolph et al. 2006). Humanes β -Defensin-2 (hBD-2) war das erste induzierbare humane antimikrobielle Protein, das entdeckt wurde (Harder et al. 1997). hBD-2 weist ein breites Wirkungsspektrum an antimikrobieller Aktivität auf und wird in zahlreichen Epithelien wie der Haut, den Atemwegen, dem Verdauungstrakt und dem Urogenitaltrakt exprimiert. Die Expression kann sowohl durch Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) (Mathews et al. 1999; Liu et al. 2003; McDermott et al. 2003; Tsutsumi-Ishii und Nagaoka 2003; Harder et al. 2004), TNF- α (Harder et al. 1997; Harder et al. 2000; Lehmann et al. 2002; McDermott et al. 2003; Nomura et al. 2003), IL-22 (Wolk et al. 2004) und IL-17 (Kao et al. 2004), als auch durch mikrobielle Stimulantien (Harder et al. 1997; Wada et al. 1999; Harder et al. 2000; O'Neil et al. 2000; Krisanaprakornkit et al. 2002; Tsutsumi-Ishii und Nagaoka 2002; Chung und Dale 2004; Harder et al. 2004; Proud et al. 2004; Wehkamp et al. 2004a; Sorensen et al. 2005) induziert werden.

Mikrobielle Strukturen (sogenannte PAMs) werden durch „Pattern Recognition“-Rezeptoren (PRR) vom angeborenen Immunsystem erkannt (Janeway und Medzhitov 2002). Das Immunsystem übersetzt die Erkennung in biochemische Signale, die zur Erregerabwehr und zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen. PRRs finden sich extrazellulär, membranständig oder intrazellulär in

verschiedenen Zellkompartimenten (Gordon 2002). Die am meisten untersuchte Gruppe der PRRs ist die Familie der „Toll-Like“-Rezeptoren (TLR), die in Leukozyten und Epithelzellen in unterschiedlichen Mustern exprimiert werden (Medzhitov et al. 1997). Bis heute wurden 10 humane TLRs identifiziert, die PAMs erkennen. Es wurde gezeigt, dass TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 10 in primären Keratinozyten exprimiert werden (Lebre et al. 2006).

Eine Klasse intrazellulärer PRRs, die in den letzten Jahren mit der Pathogenese des Morbus Crohn in Verbindung gebracht wurde, sind die „NOD-like“-Rezeptoren (NLR) (Murray 2005). Diese können wie die TLRs über eine C-terminale Leucin-reiche-Region (LRR) PAMs binden und über ihre N-terminale CARD („caspase-recruitment domain“)-Region intrazelluläre Signalkaskaden induzieren, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und MAP-Kinasen führen (Inohara et al. 1999; Girardin et al. 2001; Ogura et al. 2001b).

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation sollten einen Einblick in die Bedeutung intrazellulärer Rezeptoren, insbesondere NOD2, für die Expression des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in Keratinozyten geben. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche PAMs oder Mikroorganismen eine NOD2-vermittelte Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in primären Keratinozyten induzieren könnten. Zudem sollte ein Überblick über die in Epithelien (insbesondere Keratinozyten) exprimierten NLR-Proteine erstellt werden.

4.1 Untersuchungen am HEK293-Modell

Der intrazelluläre Rezeptor NOD2 wird als genereller Sensor von Peptidoglykan, ein Bestandteil der Zellwand von Gram-negativen wie auch Gram-positiven Bakterien, durch die Erkennung von Muramyl Dipeptid (MDP) angesehen. Das durch die LRR-Region des NOD2 erkannte MDP führt zu einer proinflammatorischen Antwort durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Girardin et al. 2003a; Inohara et al. 2003; Tanabe et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde synthetisch hergestelltes MDP verwendet, um Kontaminationen durch andere bakterielle Virulenzfaktoren auszuschließen. Es ist in der Vergangenheit vorgekommen, dass natürliche Präparationen von bakteriellen

Bestandteilen Kontaminationen beinhalteten, die letztendlich zu Fehlinterpretationen geführt haben. Beispielsweise wurde TLR2 zuerst als Rezeptor von Lipopolysacchariden (LPS) beschrieben (Kirschning et al. 1998; Yang et al. 1998), wobei sich später herausstellte, dass nicht LPS, sondern in der „verunreinigten Präparation“ vorkommende Lipoproteine die Auslöser der Aktivierung der Immunzellen waren (Travassos et al. 2004). Um solche Komplikationen auszuräumen, wurde synthetisch hergestelltes MDP käuflich erworben.

HEK293-Zellen scheinen das NOD2-Protein nicht in einer durch PCR nachweisbaren Menge zu exprimieren, was Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation ergaben. Aufgrund der fehlenden Expression von NOD2 in HEK293-Zellen, konnte diese Zelllinie als prädestiniertes Modell ausgewählt werden, die NOD2-Abhängigkeit der Stimulation mit MDP durch NOD2-Überexpressionsversuche zu untersuchen. Die HEK293-Zelllinie ist aufgrund ihrer effizienten Transfizierbarkeit mit Plasmiden für molekularbiologische Überexpressionsstudien ein sehr verbreitetes Modellsystem (Thomas und Smart 2005). Für die Überexpressionsversuche wurde zum einen ein Wildtyp NOD2-Überexpressionsplasmid benutzt, zum anderen eine mutierte Form des Wildtyps, die als NOD2-3020InsC bezeichnet wird. Das mutierte NOD2-3020InsC-Protein weist ein geringeres Molekulargewicht durch die Einfügung eines Stop-Codons in der LRR-Region auf. Dieses mutierte NOD2-Protein besitzt nur noch 1007 anstelle von 1040 Aminosäuren beim Wildtyp-Protein. Abbildung 3 verdeutlicht das geringere Molekulargewicht der Mutante im Gegensatz zum NOD2-Wildtyp-Protein. Dieses mutierte, verkürzte NOD2-Protein ist nicht mehr in der Lage, MDP zu erkennen (Girardin et al. 2003a) und wird auch mit einer Prädisposition für die entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn in Verbindung gebracht (Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001a). Morbus Crohn gehört in die Gruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, die im gesamten Magen-Darm-Trakt auftreten können. Die molekularen Mechanismen, durch die Mutationen im NOD2-Gen zum Auftreten von Morbus Crohn führen können, sind noch immer Gegenstand der Forschung. Vor kurzem wurde eine verringerte Genexpression der antimikrobiellen humanen α -Defensine-5 (HD5) und HD6 in Paneth-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn beschrieben, insbesondere bei Patienten mit einer Mutation in den LRRs von NOD2 (Wehkamp et al. 2004b). Diese Erkenntnisse beim Menschen konnten später durch ein Maus-Modell bekräftigt werden. In

Untersuchungen zeigte sich, dass Mäuse, denen das NOD2-Gen fehlt, eine geringere Menge an Maus- α -Defensinen (sogenannte Cryptdine) aufwiesen. Als Folge daraus waren die Mäuse anfälliger für orale aber nicht systemische Bakterieninfektionen (Kobayashi et al. 2005). Diese Entdeckungen haben die Hypothese gestützt, dass eine verminderte Produktion antimikrobieller Peptide die bakteriell-vermittelte Entzündung bei Morbus Crohn begünstigt (Wehkamp et al. 2005).

Dass die Stimulation von NOD2-überexprimierenden HEK293-Zellen durch MDP den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, wurde bereits beschrieben (Girardin et al. 2003a). Die Funktionalität der in dieser Arbeit verwendeten NOD2-Überexpressionsplasmide wurde durch ein Kontrollexperiment nachgewiesen, indem der bekannte Aktivierungseffekt auf NF- κ B ausgenutzt wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von NOD2-transfizierten HEK293-Zellen durch MDP den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Demgegenüber wiesen HEK293-Zellen, die mit der NOD2-Mutante 3020InsC transfiziert wurden, keine Aktivierung von NF- κ B nach MDP-Stimulation auf. So konnte man davon ausgehen, dass zum einen die Überexpression der HEK293-Zellen mit den NOD2-Plasmiden funktioniert und zum anderen auch die Funktionalität der hergestellten Überexpressionsplasmide gegeben war.

In den folgenden Versuchen sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob NOD2 durch Stimulation mit MDP als PAM eine Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 hervorrufen kann. Die Ergebnisse in dieser Arbeit verdeutlichen, dass HEK293-Zellen, die die NOD2-3020InsC-Variante überexprimieren, hBD-2 nach Stimulation mit MDP nicht induzieren. Im Gegensatz dazu weisen NOD2-überexprimierende HEK293-Zellen nach der Stimulation mit MDP eine starke Erhöhung der hBD-2-Promotoraktivierung auf (Abb. 5). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NOD2 die hBD-2-Induktion nach Stimulation mit MDP vermittelt. Durch die 3020InsC-Mutation in der NOD2-LRR-Region scheint die MDP-Erkennung und nachfolgende hBD-2-Promotoraktivierung nicht mehr gegeben zu sein. Die 3020InsC-Mutation führt wie oben beschrieben zu einem C-terminal verkürzten NOD2-Molekül, dem der letzte Teil der LRR-Region fehlt. Die hier gezeigten Daten deuten darauf hin, dass dieser N-terminale letzte LRR-Abschnitt für die Aktivierung

von NOD2 durch MDP von essentieller Bedeutung ist, da es ohne diesen Abschnitt zu keiner NOD2-vermittelten Aktivierung von NF- κ B und des hBD-2-Promotors nach MDP Stimulation kommt. Zukünftige Struktur-Untersuchungen müssen überprüfen, ob und in welcher Weise MDP an die LRR-Region von NOD2 bindet.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man die Hypothese aufstellen, dass die hBD-2-Expression bei Patienten mit Morbus Crohn, die die 3020InsC Mutation besitzen, dysreguliert sein könnte. Auch könnte dies eine Erklärung dafür sein, dass es zu einer verringerten Induktion der induzierbaren β -Defensine hBD-2 und hBD-3 bei Morbus Crohn kommt (Wehkamp et al. 2003). Weiterführende Studien müssen zeigen, ob die NOD2-vermittelte hBD-2-Expression (oder eventuell die Expression anderer antimikrobieller Peptide) in Personen, die die Mutante des NOD2-Gens tragen, dysreguliert sein könnte.

Weil der hBD-2-Promotor putative Bindungsstellen für die entzündungsrelevanten Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Position –205 bis –186 und –596 bis –572) und AP-1 (Position –127 bis –121) besitzt, wurde die Relevanz dieser Bindungsstellen für die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion durch MDP untersucht.

Die NF- κ B-Familie besteht aus verschiedenen Untereinheiten, die miteinander Dimere bilden. Im Zytoplasma liegen diese an inhibitorische I κ B-Komplexe gebunden vor, die eine Translokation in den Zellkern verhindern. Durch Phosphorylierung des Komplexes dissoziiert NF- κ B vom Inhibitor mit anschließender Translokation in den Kern und Bindung an die DNA (Li und Verma 2002). Der Transkriptionsfaktor AP-1 wird hauptsächlich mit Zellfunktionen wie der Proliferation, Apoptose und Anti-Apoptose sowie der Zelldifferenzierung assoziiert. AP-1 liegt nicht als Einzelprotein, sondern als komplexe Proteinfamilie vor, deren Subtypen untereinander Homo- und Heterodimere bilden können (Shaulian und Karin 2002).

Die von Herrn PD Dr. Jürgen Harder zu Verfügung gestellten, in verschiedenen Kombinationen mutierten hBD-2-Promotor-Plasmidkonstrukte, die mit einem Luziferase-Gen verbunden sind, sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Diese Konstrukte wurden bereits in einer früheren Doktorarbeit von Kai Wehkamp (Wehkamp 2005) verwendet, in der die molekulare Regulation der Transkription des hBD-2 in Keratinozyten charakterisiert wurde. Man fand dabei heraus, dass die durch

Pseudomonas aeruginosa-Überstände- und IL-1 β -vermittelte Induktion von hBD-2 in Keratinozyten durch NF- κ B und AP-1 kontrolliert wird (Wehkamp et al. 2006a).

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten nun den Einfluss der NF- κ B-Bindungsstellen und der AP-1-Bindungsstelle für die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion durch MDP näher charakterisieren. Tatsächlich hemmte die Mutation beider NF- κ B-Bindungsstellen sowie auch die Mutation der proximalen NF- κ B-Bindungsstelle in der hBD-2-Promotorregion die hBD-2-Promotoraktivierung in NOD2-überexprimierten HEK293-Zellen nach Stimulation mit MDP nahezu vollständig. Die Mutation der NF- κ B-Bindungsstelle an Position -596 bis -572 reduzierte die hBD-2-Promotoraktivierung nur gering.

In den folgenden Experimenten wurde eine Beteiligung von NF- κ B auf die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion nach MDP-Stimulation in HEK293-Zellen näher untersucht. In der für die Untersuchung verwendeten mutierten Form von I κ B (CMV-I κ B-DN) verhindern zwei Punktmutationen (Ser-32 \rightarrow Ala, Ser-36 \rightarrow Ala) die Phosphorylierung und die spätere proteosomale Degradation von I κ B (Traenckner et al. 1995). Daraus resultierend entsteht ein I κ B-Super-Repressor, der die NF- κ B Ausschüttung, die nukleare Translokation und die funktionelle Bindung an DNA verhindert. Dieser I κ B-Super-Repressor wurde in HEK293-Zellen ko-transfiziert und exprimiert. Dieses verhinderte die NOD2-vermittelte hBD-2-Promoteraktivierung nach Stimulation mit MDP und bestätigte die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der NOD2-vermittelten hBD-2-Induktion (Abbildung 10).

Helenalin, ein Sesquiterpen-Lacton, ist ein natürlicher Entzündungshemmer, der einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B besitzt, wobei der molekulare Mechanismus der Hemmung noch nicht geklärt werden konnte (Lyss et al. 1997; Lyss et al. 1998). Wie die Untersuchungen zeigen, konnte die MDP-vermittelte Induktion des hBD-2-Promotors in NOD2-überexprimierenden HEK293-Zellen durch die einstündige Vorinkubation der Zellen mit Helenalin von einem 7-fachen auf ein 2,5-faches reduziert werden. Auch diese Ergebnisse belegen die wichtige, essentielle Rolle von NF- κ B für die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion nach MDP-Stimulation in HEK293-Zellen.

Darüber hinaus resultierte eine Mutation der AP-1 Bindungsstelle an Position –127 bis –121 auch in einer Reduktion der NOD2-vermittelten hBD-2-Promotoraktivierung. Diese Erkenntnisse zeigen, dass NF- κ B und zu einem geringeren Maße AP-1 kritische Rollen in der Regulation der NOD2-vermittelten hBD-2-Induktion spielen. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Berichten überein, in denen die wichtige Bedeutung von NF- κ B für die hBD-2-Induktion in Epithelzellen durch die Stimulation mit Bakterien oder bakteriellen Produkten gezeigt wurde (O'Neil et al. 1999; Wada et al. 1999; O'Neil et al. 2000; Ogushi et al. 2001; Vora et al. 2004; Wehkamp et al. 2004a). Somit scheint NF- κ B ein wichtiger Transkriptionsfaktor der epithelialen angeborenen Abwehr zu sein, indem er die Expression von antimikrobiellen Proteinen wie z. B. hBD-2 durch bakterielle Stimuli vermittelt. Weiterführende Studien müssen zeigen, welche Untereinheiten von NF- κ B für die NOD2-vermittelte hBD-2-Aktivierung verantwortlich sind.

4.2 NOD-Expression in verschiedenen Geweben

Die NOD2-Expression wurde ursprünglich in Monozyten (Ogura et al. 2001b) und später auch in epithelialen Paneth-Zellen des Dünndarms (Lala et al. 2003; Ogura et al. 2003) sowie in anderen Epithelzelllinien entdeckt (Gutierrez et al. 2002; Rosenstiel et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Gewebe hinsichtlich der Expression von NOD2 untersucht. In einer Vielzahl von Geweben, wie z. B. Colon, Dünndarm, Trachea, Speicheldrüse, Knochenmark, Haut und Keratinozyten konnte eine NOD2-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Eine etwas schwächere Expression von NOD2 zeigte sich in Uterus, Magen und auch Niere, während in der Leber keine NOD2-mRNA-Expression zu detektieren war (Abb. 12). Somit scheint NOD2 in einer Vielzahl von Geweben von Bedeutung zu sein. NOD2 könnte in unterschiedlichen Geweben die Expression von hBD-2 induzieren und dadurch die angeborene Abwehr unterstützen.

Da die Haut eine hohe NOD2-mRNA-Expression aufweist, wurde die *in vivo* Protein-Expression von NOD2 mittels immunhistochemischer Färbung von Paraffinschnitten aus Normalhaut mit NOD2-Antikörpern analysiert. Wie die Fotos in Abbildung 13 belegen, konnte eine deutliche NOD2-Expression in der Epidermis lokalisiert werden,

vor allem in den äußeren Schichten, dem *Stratum corneum* und dem *Stratum granulosum*. Dies steht in Einklang mit der potentiellen Funktion von NOD2 als Sensor für PAMs, da in den äußeren Schichten der Haut der erste Kontakt zu eindringenden Mikroorganismen stattfindet. Zudem konnte die Immunreaktivität von NOD2 in talgproduzierenden Zellen, den sogenannten Sebozyten, detektiert werden. Aufgrund der starken NOD2-Expression in Sebozyten wäre eine weitergehende Untersuchung mit einer Sebozyten-Zelllinie von Interesse, da über die NOD2-Expression in Sebozyten nach derzeitigem Kenntnisstand nichts bekannt ist. Insbesondere könnte man untersuchen, ob NOD2 in Sebozyten zur Induktion von hBD-2 oder anderen antimikrobiellen Proteinen beiträgt und welche Pathogen assoziierte Moleküle für die NOD2-vermittelte Induktion von antimikrobiellen Proteinen von Bedeutung sein könnten. Es ist bekannt, dass Acne vulgaris hauptsächlich eine Erkrankung des Talgdrüsenfollikels ist und es im Verlauf der Erkrankung häufig zur Infektion mit dem Gram-positiven Hautbakterium *Propionibacterium acnes* kommt (Bojar und Hollund 2004). Denkbar wäre, dass hier eine durch Mutationen verursachte Dysregulation der NOD2-vermittelten Induktion von antimikrobiellen Proteinen vorliegt und somit Hautbakterien nicht effektiv durch antimikrobielle Proteine abgetötet werden könnten. Weitergehende Studien müssen zeigen, in wie fern antimikrobielle Proteine für die Ätiologie von Acne vulgaris von Bedeutung sind.

4.3 NOD2-Expression in Keratinozyten

4.3.1 NOD2-Proteinexpression

In Übereinstimmung mit der Entdeckung, dass Keratinozyten NOD2-mRNA exprimieren (Abb. 12), konnte die Proteinexpression von NOD2 in primären Keratinozyten durch Immunpräzipitation und anschließender Westernblot-Analyse mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 14).

Der Nachweis der Gen- und Proteinexpression von NOD2 in primären Keratinozyten, war ein erster Hinweis darauf, dass NOD2 eine Bedeutung in der kutanen angeborenen Abwehr besitzen könnte. Keratinozyten sind eine wichtige Quelle induzierbarer

antimikrobieller Peptide wie z. B. hBD-2 (Harder et al. 1997; Schröder und Harder 1999; Harder et al. 2004; Sorensen et al. 2005). Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des intrazellulären Rezeptors NOD2 eine Sekretion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 hervorruft, wurden primäre Keratinozyten mit dem NOD2-Liganden MDP stimuliert. Da NOD2 an der intrazellulären Erkennung von mikrobiellen Produkten beteiligt ist, wurde ein Protein-Transfektionsreagenz verwendet, das das MDP in die Keratinozyten schleust. Nach Stimulation der primären Keratinozyten kam es zu einem linearen Anstieg der hBD-2-Proteinexpression bei zunehmender MDP-Konzentration (Abb. 15). Dies war ein erster Beleg dafür, dass NOD2 in Keratinozyten die Expression von antimikrobiellen Proteinen vermitteln kann. Dieser Effekt deckte sich mit Versuchsergebnissen, bei denen NOD2-transfizierte HEK293-Zellen nach MDP-Stimulation eine dosisabhängige Steigerung der hBD-2-Promotoraktivierung aufwiesen (Abb. 6).

4.3.2 Hemmung der NOD2-Genexpression durch NOD2-siRNA

Die relativ neue siRNA-Methode hat sich zu einem wichtigen Werkzeug beim spezifischen „knock down“ von Genen in einer Vielzahl von Organismen sowie in menschlichen Zelllinien entwickelt (Fire et al. 1998). Weil man nicht völlig ausschließen konnte, dass andere Pathogenerkennungsmoleküle, die sich von NOD2 unterscheiden, ebenfalls MDP erkennen, wurden Experimente mit siRNA an primären Keratinozyten durchgeführt, die selektiv die Expression von NOD2 in primären Keratinozyten inhibieren sollten, um zu bekräftigen, dass die Aktivierung von NOD2 durch den Liganden MDP zu einer Induktion von hBD-2 führt. Primäre Keratinozyten, in denen durch NOD2-spezifische siRNA die Expression von NOD2 inhibiert wurde, verloren die Fähigkeit, vermehrt hBD-2 nach Stimulation mit MDP zu produzieren (Abb. 21). In diesen Zellen kam es also nicht zu einer erhöhten Ausschüttung von hBD-2 durch die Behandlung mit MDP, was bestätigt, dass die Induktion von hBD-2 in primären Keratinozyten mittels MDP durch NOD2 vermittelt wird. Wurden die primären Keratinozyten mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend mit MDP behandelt, resultierte daraus die Sekretion von hBD-2-Protein. Es kam zu keiner Änderung der hBD-2-Proteinsekretion zwischen den mit „aktivem“ MDP und zwischen den mit der inaktiven Form des MDP

(MDP-LL) behandelten NOD2-siRNA-transfizierten primären Keratinozyten. Wurden die primären Keratinozyten mit der unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert, kam es nach MDP-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung der hBD-2-Proteinsekretion im Vergleich zu den primären Keratinozyten, die mit der inaktiven Form des MDP behandelt wurden. Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung des funktionsfähigen PAMs MDP im Bezug auf die NOD2-vermittelte Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2.

Zusammengefasst konnten diese Ergebnisse erstmalig zeigen, dass NOD2 eine Bedeutung als wichtiger Mustererkennungsrezeptor in der kutanen angeborenen Abwehr besitzt. Einmal durch Peptidoglykanfragmente wie z. B. MDP aktiviert, vermittelt NOD2 die Sekretion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in Keratinozyten und stärkt dadurch das kutane angeborene Abwehrsystem.

4.3.3 NOD2-mRNA-Expression durch Stimulation mit Zytokinen

Epithelzellen reagieren auf den Kontakt mit Mikroorganismen wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa* oder mit proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL-1 β und TNF- α mit einer vermehrten Produktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 (Schröder und Harder 1999; Harder et al. 2000; Sorensen et al. 2005). Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ spielen eine zentrale Rolle bei Entzündungen und für die Immunität (Tilg und Kaser 1999; Baud und Karin 2001). Bei Morbus Crohn scheinen TNF- α , IFN- γ und IL-1 β eine wichtige Bedeutung zu haben (MacDonald et al. 1990; Fais et al. 1994; Schreiber et al. 1999). Es wurde beschrieben, dass TNF- α den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert (Sen und Baltimore 1986; Baldwin 1996). Über eine potentielle Induktion von NOD2 in primären Keratinozyten durch proinflammatorische Zytokine war nichts bekannt. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die NOD2-mRNA-Expression nach Stimulation mit TNF- α , IFN- γ und IL-1 β in primären Keratinozyten untersucht werden. Die NOD2-Genexpression wurde durch die Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α in primären Keratinozyten induziert, ein weiterer Beleg für die Rolle von NOD2 in der kutanen Abwehr. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse zu untersuchen, ob die Expression von NOD2 auch in entzündlichen und infektiösen Hauterkrankungen (wie

z. B. der Psoriasis und atopischen Dermatitis) alteriert ist. Dass TNF- α die NOD2-mRNA-Expression in primären Keratinozyten induziert, deckt sich mit Untersuchungsergebnissen, bei denen in intestinalen Epithelzellen ein zeit- und dosisabhängiger Anstieg der NOD2-mRNA- und Proteinexpression durch die Behandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α hervorgerufen wurde (Rosenstiel et al. 2003). Auch in einer anderen Studie wird beschrieben, dass die NOD2-mRNA-Expression in myeloblastischen und epithelialen Zellen durch die Stimulation mit TNF- α hochreguliert wurde (Gutierrez et al. 2002).

Stimulierte man primäre Keratinozyten mit IFN- γ , resultierte dieses in einer etwa doppelt so hohen NOD2-Genexpression im Vergleich zu IL-1 β und TNF- α . Somit scheint IFN- γ ebenfalls einen induzierenden Einfluss auf die NOD2-mRNA-Expression in primären Keratinozyten zu besitzen. Von Rosenstiel et al. wurde 2003 beschrieben, dass die Stimulation mit IFN- γ lediglich einen geringen Einfluss auf die NOD2-Expression in intestinalen Epithelzellen besitzt. Wurden allerdings IFN- γ und TNF- α in intestinalen Epithelzellen ko-stimuliert, führte dieses zu einer Induktion der NOD2-mRNA-Expression (Rosenstiel et al. 2003). Ob ein ähnlicher Effekt bei der Kostimulation von TNF- α und IFN- γ in primären Keratinozyten auftritt, müsste durch Folgeexperimente untersucht werden.

4.3.4 HBD-2-mRNA-Expression in Keratinozyten durch Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*-Überständen

Pseudomonas aeruginosa ist ein ubiquitär vorkommendes, fakultativ anaerobes, Gram-negatives Bakterium. Trotz der Tatsache, dass *Pseudomonas aeruginosa* in gesunden Organismen kaum Infektionen auslöst, gilt er als opportunistischer, humanpathogener Erreger, der für zahlreiche nosokomiale Infektionen (Hospitalismuserreger) verantwortlich ist. Der Grund dafür ist, dass *P. aeruginosa* eine hohe Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika besitzt (Cunha 2002). Vor allem Personen mit geschwächter Immunabwehr entwickeln *P. aeruginosa*-Infektionen. Die hohe Pathogenität von *P. aeruginosa* beruht auf der Expression und dem Zusammenwirken mehrerer Virulenzfaktoren. Die Virulenz von *P. aeruginosa* ist multifunktional, was mehrere Zell-assoziierte und sezernierte Proteine wie

beispielsweise Elastase A (Johnson et al. 1982), Phospholipase C (Wielund et al. 2002) umfasst, und solchen, die durch ein Typ-III-Sekretionssystem eingeschleust werden (Sato und Frank 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass *P. aeruginosa*-Kulturüberstände die hBD-2-Expression in Keratinozyten durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 kontrollieren (Wehkamp et al. 2006b). Studien haben gezeigt, dass bakterielle Produkte wie LPS, Flagellin und CpG DNA von *P. aeruginosa* starke Aktivatoren der extrazellulären Rezeptoren TLR4 (Hajjar et al. 2002), TLR5 (Zhang et al. 2003) und TLR9 (Greene et al. 2005) sind. Travassos et al. beschrieben 2005 in einer Publikation, dass der intrazelluläre Rezeptor NOD1 das Peptidoglykan intrazellulärer *P. aeruginosa* detektiert, was eine NF- κ B Aktivierung zur Folge hatte (Travassos et al. 2005).

Da *P. aeruginosa* (PA)-Kulturüberstände die hBD-2-Expression in Keratinozyten induzierten, sollten Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit klären, welche Rolle der intrazelluläre Rezeptor NOD2 in diesem System spielt. Hierfür wurden NOD2-transfizierte primäre Keratinozyten mit PA-Überständen stimuliert und die NOD2- bzw. hBD-2-mRNA-Expression durch „Realtime“-PCR quantifiziert. Es zeigte sich keine erhöhte Induktion der hBD-2-mRNA-Expression in NOD2-überexprimierenden Keratinozyten (Abb. 18), was darauf hindeutet, dass *P. aeruginosa*-Kulturüberstände die hBD-2-Expression in Keratinozyten zwar induzieren, diese Induktion aber nicht über NOD2 vermittelt wird. Denkbar wäre, dass die PA-induzierte hBD-2-Expression durch andere intrazelluläre oder extrazelluläre Rezeptoren vermittelt werden könnte. Man könnte zudem spekulieren, dass die in den PA-Kulturüberständen enthaltenen PAMs nicht in die Zelle gelangen und somit von intrazellulären Rezeptoren wie NOD2 nicht erkannt werden können. Dieses hätte zur Folge, dass NOD2 die Induktion von hBD-2 nicht vermitteln könnte. Um die in den PA-Kulturüberständen enthaltenen PAMs in die Epithelzelle zu transportieren und dort die Erkennung der PAMs durch Rezeptoren wie NOD2 zu ermöglichen, müsste man ein Vehikel wie z. B. die bei der Biofilm-Bildung verstärkt exprimierte Glycolipide (z. B. Rhamnolipide) benutzen (Schwichtenberg 2003; Soberon-Chavez et al. 2005). Um diese Hypothesen zu untersuchen, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.4 Bedeutung von NOD-Rezeptoren für die Unterscheidung von pathogenen und nicht-pathogenen Bakterien

Keratinocyten sind permanent Bakterien oder bakteriellen Produkten ausgesetzt. Viele dieser Bakterien gehören zur normalen Standortflora, und deren Bekämpfung wäre nicht sinnvoll. Deshalb kann man die Hypothese aufstellen, dass die Haut und andere Epithelien in der Lage sind, zwischen der körpereigenen Flora und potentiell pathogenen Erregern zu unterscheiden. Erste Hinweise wurden bereits durch Untersuchungen bestätigt, in denen gezeigt wurde, dass kommensale orale und kutane Bakterien in Keratinocyten andere Signaltransduktionswege aktivieren als pathogene Bakterien (Chung und Dale 2004).

Die Besiedlung der humanen Haut mit pathogenen Staphylokokken wie *Staphylococcus aureus* und Streptokokken ist ein charakteristisches Merkmal bei mehreren Hauterkrankungen (z. B. atopische Dermatitis) und hat häufig zur Folge, dass diese pathogenen Bakterien in die Keratinocyten eindringen (Schrager et al. 1996; Donnarumma et al. 2004; Menzies und Kenoyer 2005). Es wird vermutet, dass insbesondere intrazelluläre PRRs wie die NOD-Rezeptoren in der Lage sind, potentiell pathogene invasive Bakterien zu erkennen. Somit lässt die funktionelle Expression von NOD2 in Keratinocyten vermuten, dass NOD2 in Keratinocyten zur Erkennung von pathogenen invasiven Bakterien beitragen könnte - eine Hypothese, die in weiterführenden Studien noch bewiesen werden muss.

In einer jüngeren Untersuchung wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von Abwehrmolekülen des Wirts im Zytosol auch durch nicht-invasive pathogene Bakterien verursacht werden kann. Es wurde berichtet, dass *Helicobacter pylori* von Epithelzellen über NOD1, einem intrazellulären Rezeptor mit einer Spezifität für Peptidoglykan Gram-negativer Bakterien, erkannt wurde (Viala et al. 2004). Die Aktivierung von NOD1 wurde durch die direkte Abgabe von Peptidoglykanfragmenten durch ein bakterielles Typ-IV-Proteinsekretionssystem vermittelt. Diese Untersuchungen demonstrieren, dass nicht-invasive Bakterien Abwehrmoleküle des Wirts im Zytosol wie z. B. NODs aktivieren können. Bakterielle Sekretionssysteme sind in verschiedenen Bakterienspezies weit verbreitet und oft mit virulenten Stämmen assoziiert (Pallen et al. 2003). Folglich könnte man spekulieren, dass die

Einschleusung von PAMs durch bakterielle Sekretionssysteme in Epithelzellen einen generellen Mechanismus zur Aktivierung von Abwehrmolekülen des Wirts im Zytosol darstellt. Die Einschleusung von bakteriellen Produkten in die Zelle könnte als „Alarmsignal“ für die angeborene Immunabwehr des Wirts fungieren und diesem somit erlauben, zwischen pathogenen und kommensalen Bakterien zu unterscheiden (Philpott und Girardin 2004). Die Erkennung von intrazellulären Bakterienprodukten stellt in Epithelzellen immer eine gefährliche Situation dar, welche eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems erfordert. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass ein Teil dieser Aktivierung die NOD2-vermittelte erhöhte Produktion von antimikrobiellen Proteinen sein könnte.

4.5 NOD2-vermittelte hBD-2-mRNA-Expression in CaCo-2- und MKN-45-Zellen durch Stimulation mit *Salmonella typhimurium*

Salmonellen sind Gram-negative aerobe (fakultativ anaerobe) Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Salmonellen können verschiedene Krankheiten auslösen, die zu den Zoonosen gehören, da sie den Menschen sowohl über Tiere als auch über die Lebensmittelkette infizieren können. Der Erreger kann dabei sowohl freilebend (extrazelluläre Lebensweise) als auch innerhalb von Wirtszellen (intrazelluläre Lebensweise) gefunden werden. Eine Infektion löst beim Menschen Durchfallerkrankungen aus. *Salmonella typhimurium* benutzt Typ-III-Sekretionssysteme (hochkomplexe Multiproteinapparate), die in vielen Gram-negativen Bakterien vorkommen, um eine Vielzahl verschiedener bakterieller Proteine ins Zytoplasma von eukaryotischen Zellen zu translozieren (Cornelis 2000; Cornelis und Van Gijsegem 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand der humanen Colonkarzinomzelllinie CaCo-2 und der humanen Magenkarzinomzelllinie MKN-45 untersucht werden, ob eine hBD-2-Induktion durch Stimulation mit Lebendkulturen von *Salmonella typhimurium* über NOD2 vermittelt wird. Hisamatsu et al. haben 2003 beschrieben, dass NOD2 in intestinalen Epithelzellen sowie in primären intestinalen Epithelzellen exprimiert wird und hier als antimikrobieller Faktor zu fungieren scheint, da die Anzahl der überlebenden invasiven *Salmonella typhimurium*-Bakterien in NOD2-transfizierten

CaCo-2-Zellen geringer als bei den untransfizierten CaCo-2-Zellen war. Ähnlich wie untransfizierte CaCo-2-Zellen wurden *Salmonella typhimurium*-Bakterien in CaCo-2-Zellen, die mit der NOD2-Mutante 3020InsC transfiziert waren, kaum in ihrer Überlebensfähigkeit beeinträchtigt (Hisamatsu et al. 2003). NOD2 scheint somit an der epithelialen Abwehr gegen *Salmonella typhimurium* beteiligt zu sein.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass die hBD-2-mRNA-Induktion durch *Salmonella typhimurium* in NOD2-transfizierten CaCo-2-Zellen nicht höher war als in Kontroll-Plasmid-transfizierten Zellen. Die hBD-2-mRNA-Expression in NOD2-transfizierten CaCo-2-Zellen reduzierte sich um etwa 50 %. Damit scheint NOD2 die Genexpression des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in CaCo-2-Zellen nicht zu vermitteln, und somit scheint hBD-2 auch nicht für die von Hisamatsu et al. 2003 beschriebene antibakterielle Wirkung gegen *Salmonella typhimurium*-Bakterien in NOD2-transfizierten CaCo-2-Zellen verantwortlich zu sein.

Stimulationsversuche mit MKN-45-Zellen ergaben ähnliche Ergebnisse. In NOD2-transfizierten MKN-45-Zellen wurde die hBD-2-mRNA-Expression im Vergleich zu Kontroll-Plasmid-transfizierten Zellen nach der Stimulation mit *Salmonella typhimurium* nicht erhöht. NOD2 vermittelt auch hier die Genexpression des antimikrobiellen Peptids hBD-2 nicht. Die Ergebnisse bezüglich der hBD-2-Genexpression in CaCo-2- und MKN-45-Zellen nach Stimulation mit *Salmonella typhimurium* weisen somit darauf hin, dass eine *Salmonella typhimurium*-induzierte hBD-2-Genexpression nicht über NOD2 vermittelt wird. Ob die durch das enteroinvasive Bakterium *Salmonella typhimurium* induzierte hBD-2-Expression durch andere Rezeptoren reguliert werden könnte, müsste durch Folgeuntersuchungen geklärt werden. Des Weiteren sollten Stimulationsversuche mit anderen invasiven Bakterien klären, ob es in CaCo-2- oder MKN-45 zu einer NOD2-vermittelten hBD-2-Expression kommen könnte.

4.6 Expression von anderen NLR-Proteine in primären Keratinozyten

Die Rolle von NLR-Proteinen bei der Immunabwehr in Epithelzellen ist weitgehend unbekannt. In der letzten Zeit wurde allerdings intensiv auf diesem Gebiet geforscht.

Es wurde beispielsweise in mehreren Studien gezeigt, dass es zu einer NOD1-abhängigen NF- κ B-Aktivierung bei der Induktion von β -Defensinen und Chemokinen als Antwort auf eine Infektion mit *Helicobacter pylori* (Viala et al. 2004; Boughan et al. 2006), enteroinvasiven *Escherichia coli* (Kim et al. 2004) und *Shigella flexneri* (Girardin et al. 2001) kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass NOD2 die Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in primären Keratinozyten vermittelt (Voss et al. 2006).

Im Folgenden sollte aufgezeigt werden, welche anderen NLR-Proteine neben NOD2 in primären Keratinozyten exprimiert werden. Die getesteten cDNAs stammten aus Versuchen mit primären Keratinozyten, die mit dem Phorbol ester Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA) sowie Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert wurden. Von 20 getesteten NLR-Proteinen wurde die relative mRNA-Expression von sieben NLR-Proteinen in primären Keratinozyten detektiert. Darunter waren NALP1, NALP2, NALP10, NOD1, NOD2, NOD9 und NOD27, wobei die Expression von NOD27 in PMA-stimulierter cDNA nicht nachgewiesen werden konnte. Dabei zeigte sich eine erhöhte Induktion der NALP10 mRNA-Expression nach Stimulation der primären Keratinozyten mit PMA. Neben der mäßigen Induktion von NOD2 zeigte sich kaum eine Induktion der übrigen NLR-Proteine in primäre Keratinozyten, die mit Kulturüberständen von *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert worden waren.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass neben NOD2 auch andere NLR-Proteine in Keratinozyten exprimiert werden. Welchen Einfluss diese intrazellulären Proteine auf die Freisetzung von antimikrobiellen Proteinen wie z. B. hBD-2, hBD-3, RNase 7 und 8 sowie Psoriasin besitzen, müsste durch weitergehende Untersuchungen aufgezeigt werden.

4.7 Ausblick

Die Daten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es zu einer funktionellen Expression von NOD2 in primären Keratinozyten kommt. Es besteht eine Verbindung zwischen der Aktivierung von NOD2 durch dessen Liganden MDP und einer gesteigerten hBD-2-Produktion in primären Keratinozyten. Hierfür würden Untersuchungen von Interesse sein, die klären, ob NOD2-Mutationen oder die

Dysregulation von NOD2 mit einer erhöhten Anfälligkeit für Hautinfektionen assoziiert sind. Insbesondere wären Hautinfektionen, die mit einer verminderten Expression und Induktion von antimikrobiellen Peptiden (z. B. atopische Dermatitis) assoziiert sind (Ong et al. 2002; Nomura et al. 2003; Ong 2006), ein favorisiertes Modell, um diese interessante Hypothese zu untersuchen.

Ein weiteres Ziel von Untersuchungen könnte sein, weitere potentiell pathogene invasive Bakterien, die die hBD-2-Expression induzieren, zu identifizieren. Zudem sollte geklärt werden, über welche PRRs (NLRs oder TLRs) diese Regulation vermittelt wird.

Aufgrund der starken Expression von NOD2 in Sebozyten wären weitere Untersuchungen mit einer Sebozyten-Zelllinie interessant. Gerade im Hinblick auf Hauterkrankungen wie beispielsweise der *Acne vulgaris*, in deren Verlauf es häufig zu Infektionen mit *Propionibacterium acnes* kommt, wäre ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen von Vorteil, um gegebenenfalls neue Therapieansätze zu entwickeln.

Zusammengefasst weisen die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass NOD2 zur epithelialen angeborenen Immunität durch die Vermittlung der Expression des induzierbaren antimikrobiellen Peptids hBD-2 beiträgt. Es lässt sich die Hypothese aufstellen (siehe Abb. 29), dass die durch PAMs vermittelte Aktivierung von bestimmten NLR-Proteinen in Keratinozyten zu einer Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden und Chemokinen führt, die nachfolgend die Haut vor Infektionen schützen.

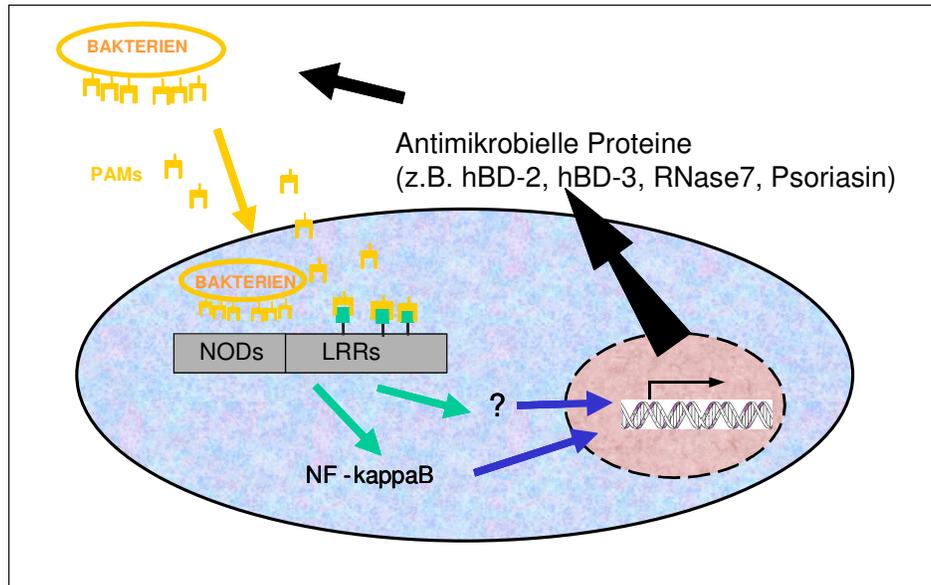


Abb. 29: Hypothetische Rolle der NLR-Proteine in primären Keratinozyten. Die NLR-Proteine wie z. B. NOD2 sind durch die LRR-Region in der Lage, Mikroorganismen und deren Produkte (PAMs) zu erkennen. Dieses führt zu einer Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren (z. B. NF-kappaB), die ihrerseits die Produktion von antimikrobiellen Proteinen vermitteln.

Ein besseres Verständnis der Signaltransduktionswege, die zur Induktion von antimikrobiellen Proteinen führen, könnte für spätere therapeutische Ansätze genutzt werden, durch die das angeborene Abwehrsystem gestärkt wird.

5. Zusammenfassung

Die Produktion von induzierbaren antimikrobiellen Proteinen bietet eine erste und schnelle Abwehrreaktion der Haut und anderer Epithelien gegen eindringende Mikroorganismen. Humanes β -Defensin-2 (hBD-2) ist ein induzierbares antimikrobielles Peptid, das in verschiedenen Epithelien sowohl durch extrazelluläre als auch durch intrazelluläre bakterielle Faktoren induziert werden kann. Die Familie der intrazellulären „NOD-like“-Rezeptoren (NLRs) ist eine wichtige Gruppe von Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems. Ein Mitglied dieser Gruppe, das „nucleotide-binding oligomerization domain protein 2“ (NOD2), ist ein zytosolisches Rezeptorprotein, das an der intrazellulären Erkennung von Mikroorganismen durch Interaktion mit Peptidoglykanfragmenten (z. B. Muramyl Dipeptid) beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung von NOD2 für die Induktion von antimikrobiellen Peptiden, insbesondere von hBD-2, untersucht werden.

Mit einem 2,3 kb großen hBD-2-Promotorfragment, integriert in einen Luziferase-Promotor-Testvektor, wurde die Hypothese überprüft, dass NOD2 die Induktion von hBD-2 vermittelt. Die Aktivierung von NOD2 in NOD2-überexprimierenden HEK293-Zellen durch dessen Liganden Muramyl Dipeptid (MDP) induzierte die hBD-2-Expression. Im Gegensatz dazu resultierte die Überexpression mit dem die Rastermutation 3020InsC enthaltenden NOD2 - die am häufigsten vorkommende NOD2-Variante, die mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn assoziiert ist - in einer verringerten Induktion von hBD-2 durch MDP. Luziferase-Genreporter-Tests und zielgerichtete Mutationsexperimente zeigten, dass die funktionellen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren NF- κ B („nuclear factor-kappaB“) und AP-1 („activator protein-1“) im hBD-2-Promotor essentiell für eine NOD2-vermittelte Induktion von hBD-2 durch MDP sind. Darüber hinaus hemmten sowohl der NF- κ B-Inhibitor Helenalin als auch die Super-Repressorform des NF- κ B-Inhibitors I κ B („inhibitor of NF- κ B“) die NOD2-vermittelte hBD-2-Promotoraktivierung.

Die NOD2-mRNA-Expression konnte in verschiedenen epithelialen Geweben, unter anderem in der Haut und in Keratinozyten, detektiert werden. Immunhistochemische

Untersuchungen an Hautschnitten mit NOD2-spezifischen Antikörpern zeigten eine NOD2-Expression in der Epidermis und in Sebozyten. In primären Keratinozyten wurde die Expression von NOD2 nachgewiesen, und die Stimulation dieser Zellen mit MDP induzierte die Freisetzung von hBD-2. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis kam es bei einer siRNA-vermittelten Blockierung der NOD2-Expression in primären Keratinozyten zu einer verminderten hBD-2-Proteinexpression nach MDP-Behandlung.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturüberständen sowie mit *Salmonella typhimurium*-Kulturen auf die NOD2-vermittelte hBD-2-Induktion untersucht. Die Stimulation mit *P. aeruginosa*-Kulturüberständen induzierte die hBD-2-Expression in primären Keratinozyten, diese Induktion wurde allerdings nicht in NOD2-überexprimierenden Keratinozyten verstärkt. Auch die hBD-2-mRNA-Expression in CaCo-2- und MKN-45-Zellen wurde nach Stimulation mit *Salmonella typhimurium* ebenfalls nicht durch Überexpression von NOD2 in CaCo-2- und MKN-45-Zellen erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NOD2 für die hBD-2-Induktion durch *Pseudomonas aeruginosa*-Überstände und *Salmonella typhimurium* nicht von Bedeutung ist.

Darüber hinaus wurden primäre Keratinozyten auf die mögliche mRNA-Expression weiterer NLR-Proteine untersucht. Neben NOD2 konnte auch die mRNA-Expression von NALP1, NALP2, NALP10, NOD1, NOD9 und NOD27 nachgewiesen werden.

Zusammengefasst weisen die Daten darauf hin, dass NOD2 durch Stimulation mit MDP zur epithelialen angeborenen Immunität durch die Vermittlung der Expression des induzierbaren antimikrobiellen Peptids hBD-2 beiträgt. Ein besseres Verständnis der Signaltransduktionswege, die zur Induktion von antimikrobiellen Proteinen führen, könnte für spätere therapeutische Ansätze genutzt werden, durch die das angeborene Abwehrsystem gestärkt wird.

6. Summary

Production of inducible antimicrobial peptides offers epithelial cells a first and rapid defense response towards invading microbes. Human beta-defensin-2 (hBD-2) is an antimicrobial peptide that can be induced in various epithelia upon extracellular as well as intracellular bacterial challenge. One important group of pattern recognition receptors in innate immunity is the family of NOD-like receptors (NLR). Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2 (NOD2/CARD15) is a cytosolic receptor protein involved in intracellular recognition of microbes by sensing peptidoglycan fragments (e.g. muramyl dipeptide). The aim of this study was to investigate the role of NOD2 for the induction of the antimicrobial peptide hBD-2.

Luciferase as a reporter gene for a 2.3 kb hBD-2 promoter was used to test the hypothesis that NOD2 mediates the induction of hBD-2. Activation of NOD2 in NOD2-overexpressing HEK293 cells via its ligand muramyl dipeptide (MDP) caused induction of hBD-2 expression. In contrast, overexpression of NOD2 containing the 3020InsC frameshift mutation, the most frequent NOD2 variant associated with Crohn's disease, resulted in a reduced induction of hBD-2 by MDP. Luciferase gene reporter analyses and site directed mutagenesis experiments demonstrated that functional binding sites for NF- κ B (nuclear factor-kappaB) and AP-1 (activator protein 1) in the hBD-2 promoter region are required for NOD2-mediated induction of hBD-2 through MDP. Moreover, the NF- κ B inhibitor Helenalin as well as a super-repressor form of the NF- κ B inhibitor I κ B (inhibitor of NF- κ B) strongly inhibited NOD2-mediated hBD-2 promoter activation.

NOD2 mRNA expression was detected in various epithelial tissues including skin and keratinocytes. Immunohistochemical analyses using NOD2 specific antibodies revealed the expression of NOD2 in epidermis and sebocytes.

Expression of NOD2 was detected in primary keratinocytes and stimulation of these cells with MDP induced hBD-2 peptide release. Consistently, siRNA-mediated downregulation of NOD2 expression in primary keratinocytes resulted in a reduced induction of hBD-2 upon MDP treatment.

Further investigations should gain more insight into the role of NOD2-mediated induction of hBD-2 upon stimulation with supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* as well as *Salmonella typhimurium*. In primary keratinocytes upregulation of hBD-2 was induced upon stimulation by supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* but this induction was not increased in NOD2-overexpressing keratinocytes. Gene expression of hBD-2 in CaCo-2- or MKN-45-cells after stimulation with *Salmonella typhimurium* was also not upregulated in NOD2-overexpressing CaCo-2- and MKN-45-cells. These data suggest that NOD2 does not mediate the induction of hBD-2 by *Salmonella typhimurium* and supernatants of *Pseudomonas aeruginosa*.

Furthermore expression of other NLR proteins could be detected in primary keratinocytes. Beside NOD2 mRNA expression of NALP1, NALP2, NALP10, NOD1, NOD9 and NOD27 was detected.

Together, these data suggest that NOD2 after MDP stimulation serves as an intracellular pattern recognition receptor (PRR) to enhance epithelial innate immunity by inducing the expression of antimicrobial peptides such as hBD-2. A better understanding of signal transduction pathways which lead to induction of antimicrobial proteins could be useful for the development of therapies strengthening innate immunity.

7. Literaturverzeichnis

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801
- Baldwin AS, Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683
- Baud V, Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11:372-377
- Bojar RA, Holland KT (2004) Acne and *Propionibacterium acnes*. *Clin Dermatol* 22:375-379
- Boman HG (2000) Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173:5-16
- Boman HG (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254:197-215
- Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, Park JH, Ewings KE, Bowie AG, Ong SJ, Cook SJ, Sorensen OE, Manzo BA, Klein NJ, Nunez G, Atherton JC, Bajaj-Elliott M (2006) Nucleotide-binding oligomerisation domain-1 (NOD-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR): Critical regulators of beta -defensins during *helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem*
- Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ (2003) Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 5:581-592
- Chung WO, Dale BA (2004) Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. *Infect Immun* 72:352-358
- Cornelis GR (2000) Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:681-693
- Cornelis GR, Van Gijsegem F (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* 54:735-774
- Cunha BA (2002) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. *Semin Respir Infect* 17:231-239
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833
- Diamond G, Zasloff M, Eck H, Bresseur M, Maloy WL, Bevins CL (1991) 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

- Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Tufano MA, Baroni A (2004) Alpha-MSH reduces the internalization of *Staphylococcus aureus* and down-regulates HSP 70, integrins and cytokine expression in human keratinocyte cell lines. *Exp Dermatol* 13:748-754
- Fais S, Capobianchi M, Silvestri M, Mercuri F, Pallone F, Dianzani F (1994) Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *J Interferon Res* 14:235-238
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811
- Fitzpatrick T, Eisen A, Wolff K, Freedberg I, Austen K (1993) *Dermatology in general medicine*.
- Gallo R (1971) Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* 234:194-198
- Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720
- Ganz T, Lehrer RI (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 10:41-44
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ (2003a) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278:8869-8872.
- Girardin SE, Tournebise R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ (2001) CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2:736-742
- Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Lecreux D (2003b) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* 278:41702-41708
- Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2005) Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 6:57-64
- Gordon S (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930
- Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O'Neill S J, McElvaney NG (2005) TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol* 174:1638-1646

- Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL (2002) Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 277:41701-41705.
- Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI (2002) Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol* 3:354-359
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG (2001) Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357:1925-1928
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707-5713
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM (2000) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:714-721
- Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM (2004) Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 123:522-529
- Harder J, Schröder JM (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277:46779-46784
- Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124:993-1000.
- Hoffmann JA (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426:33-38
- Huang GT, Zhang HB, Kim D, Liu L, Ganz T (2002) A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities in vivo. *Hum Gene Ther* 13:2017-2025
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603

- Innis M, Myambo K, Gelfand D, Brow M (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9436-9440
- Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 274:14560-14567
- Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G (2001) Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 276:2551-2554.
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G (2003) Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278:5509-5512.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216
- Johnson DA, Carter-Hamm B, Dralle WM (1982) Inactivation of human bronchial mucosal proteinase inhibitor by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Am Rev Respir Dis* 126:1070-1073
- Kaisho T, Akira S (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117:979-987; quiz 988
- Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R (2004) IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol* 173:3482-3491
- Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF (2004) Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* 72:1487-1495
- Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M (1998) Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 188:2091-2097
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307:731-734
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA (2002) Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J Immunol* 168:316-324
- Kunkel T (1992) DNA replication fidelity. *J Biol Chem* 279:16895-16898

- Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S (2003) Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125:47-57
- Lebre MC, van der Aar AM, van Baarsen L, van Capel TM, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, de Jong EC (2006) Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*
- Lehmann J, Retz M, Harder J, Krams M, Kellner U, Hartmann J, Hohgrawe K, Raffenberg U, Gerber M, Loch T, Weichert-Jacobsen K, Stockle M (2002) Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infect Dis* 2:20
- Li Q, Verma IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-734
- Liu L, Roberts AA, Ganz T (2003) By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 170:575-580
- Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, Pahl HL, Merfort I (1998) The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. *J Biol Chem* 273:33508-33516
- Lyss G, Schmidt TJ, Merfort I, Pahl HL (1997) Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kappaB. *Biol Chem* 378:951-961
- MacDonald T, Hutchings P, Choy M, Murch S, Cooke A (1990) Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 81:301-305
- Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB, Jr. (1999) Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 67:2740-2745
- McDermott AM, Redfern RL, Zhang B, Pei Y, Huang L, Proske RJ (2003) Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1beta stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1859-1865
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397
- Menzies BE, Kenoyer A (2005) Staphylococcus aureus infection of epidermal keratinocytes promotes expression of innate antimicrobial peptides. *Infect Immun* 73:5241-5244
- Meylan E, Tschopp J, Karin M (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442:39-44

- Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Hafner R, Chamaillard M, Zouali H, Thomas G, Hugot JP (2001) CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* 29:19-20
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51:Pt 1:263-273
- Murray PJ (2005) NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr Opin Immunol* 17:352-358
- Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I (2004) Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 111:273-281
- Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY (2003) Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 171:3262-3269
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH (2001a) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:603-606
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G (2001b) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276:4812-4818.
- Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, Zimmermann E, Tretiakova M, Cho JH, Hart J, Greenson JK, Keshav S, Nunez G (2003) Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52:1591-1597
- Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, Takahashi A, Asakura H, Makino S, Hojo H, Nakahara Y, Ohsaki M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Moss J, Hirayama T (2001) Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem* 276:30521-30526
- O'Neil DA, Cole SP, Martin-Porter E, Housley MP, Liu L, Ganz T, Kagnoff MF (2000) Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect Immun* 68:5412-5415
- O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF (1999) Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 163:6718-6724
- Ong PY (2006) Is/are pattern recognition receptor(s) for *Staphylococcus aureus* defective in atopic dermatitis? *Dermatology* 212:19-22

- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 347:1151-1160
- Pallen MJ, Chaudhuri RR, Henderson IR (2003) Genomic analysis of secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 6:519-527
- Philpott DJ, Girardin SE (2004) The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* 41:1099-1108
- Philpott DJ, Yamaoka S, Israel A, Sansonetti PJ (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* 165:903-914
- Proud D, Sanders SP, Wiehler S (2004) Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo. *J Immunol* 172:4637-4645
- Raman M, Cobb MH (2003) MAP kinase modules: many roads home. *Curr Biol* 13:R886-888
- Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seeger D, Schreiber S (2003) TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124:1001-1009.
- Rudolph B, Podschun R, Sahly H, Schubert S, Schröder JM, Harder J (2006) Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3194-3196
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harb Laboratory Press, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104-108
- Sato H, Frank DW (2004) ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* 53:1279-1290
- Schrager HM, Rheinwald JG, Wessels MR (1996) Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J Clin Invest* 98:1954-1958
- Schreiber S, Nicolaus S, Hampe J, Hamling J, Koop I, Groessner B, Lochs H, Raedler A (1999) Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 353:459-461
- Schröder JM (1999a) Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 56:32-46

- Schröder JM (1999b) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 57:121-134
- Schröder JM, Harder J (1999) Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 31:645-651
- Schwichtenberg L (2003) Die Bedeutung Pathogen-assoziiertes Moleküle bei der Induktion epithelialer antimikrobieller Proteine und proinflammatorischer Zytokine. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46:705-716
- Shaulian E, Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:E131-136
- Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:718-725
- Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T (2005) Differential Regulation of β -Defensin Expression in Human Skin by Microbial Stimuli. *J Immunol* 174:4870-4879
- Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14
- Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G, Williams CJ, Inohara N, Nunez G (2004) Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *Embo J* 23:1587-1597
- Thomas P, Smart TG (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51:187-200
- Tilg H, Kaser A (1999) Interferons and their role in inflammation. *Curr Pharm Des* 5:771-785
- Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA (1995) Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* 14:2876-2883
- Travassos LH, Carneiro LA, Girardin SE, Boneca IG, Lemos R, Bozza MT, Domingues RC, Coyle AJ, Bertin J, Philpott DJ, Plotkowski MC (2005) Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 280:36714-36718
- Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C, Boneca IG (2004) Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 5:1000-1006
- Tschopp J, Martinon F, Burns K (2003) NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:95-104

- Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I (2002) NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol* 71:154-162
- Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I (2003) Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J Immunol* 170:4226-4236
- Underhill DM, Ozinsky A (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14:103-110
- Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 5:1166-1174
- Viarki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J (1999) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, La Jolla, California
- Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT (2004) Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 173:5398-5405
- Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J (2006) NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* 281:2005-2011
- Wada A, Mori N, Oishi K, Hojo H, Nakahara Y, Hamanaka Y, Nagashima M, Sekine I, Ogushi K, Niidome T, Nagatake T, Moss J, Hirayama T (1999) Induction of human beta-defensin-2 mRNA expression by *Helicobacter pylori* in human gastric cell line MKN45 cells on cag pathogenicity island. *Biochem Biophys Res Commun* 263:770-774
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schroder JM, Stange EF (2004a) NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 72:5750-5758
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF (2003) Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 9:215-223

- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF (2004b) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53:1658-1664
- Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF (2005) Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 77:460-465
- Wehkamp K (2005) Untersuchungen zur molekularen Regulation der Transkription des humanen beta-Defensin-2 in epidermalen Keratinozyten. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM, Harder J (2006a) Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J Invest Dermatol* 126:121-127
- Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM, Harder J (2006b) Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J Invest Dermatol* 126:121-127
- Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G (2002) Pulmonary inflammation induced by Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70:1352-1358
- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21:241-254
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528
- Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284-288
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395
- Zhang J, Xu K, Ambati B, Yu FS (2003) Toll-like receptor 5-mediated corneal epithelial inflammatory responses to Pseudomonas aeruginosa flagellin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4247-4254

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure
AD	„activation domain“
Ala	Alanin
AMP	antimikrobielles Protein
AP-1	„activator protein-1“/Transkriptions-Aktivierungsprotein 1
<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
ATCC	„american type culture collection“
BIR	„baculovirus inhibitor of apoptosis repeat“
bp	„base pair“/Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“/bovines Serumalbumin
ca.	circa
CaCo	„human colon adenocarcinoma“
CARD	„caspase recruitment domain“
cDNA	„mRNA complementary DNA“/zur mRNA komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
CIITA	„MHC class II transactivator“
cy5	Cyaninfarbstoff 5
Da	Dalton
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle's medium“/ Nährmedium für Zelllinien
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelnegativ
DNA	„desoxyribonucleic acid“/Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“/Enzym vermitteltes immunologisches Nachweisverfahren
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> = und andere
FCS	„fetale calf serum“/fetales Kälberserum
FIIND	„function to find“
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GlcNAc	N-Acetylglucosaminsäure
GSP	Genspezifischer Primer
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
hBD	humanes Beta-Defensin
HCl	Salzsäure
HD	humanes Defensin (gehört zur Gruppe der alpha-Definsine)
HEK	„human embryonal kidney“
HET-E	„plant het product involved in vegative incompatibility“
ICE	„Interleukin 1 converting enzyme“

iE-DAP	γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
IL	Interleukin
IPAF	“ICE protease-activating factor”
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	“leucine-rich repeat”
M	Molar (mol/l)
MDP	N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamine/Muramyl Dipeptid
<i>meso</i> -DAP	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure
MG-Medium	magnesiumhaltiges Bakteriennährmedium
MHC	“major histocompatibility complex”
min	Minute(n)
MKN	“human gastric adenocarcinoma, stomach”
mRNA	“messenger RNA”
MurNAc	N-Acetylmuramylsäure
NACHT	“Naip, CIITA, HET-E and TP-1”
NAD	“NACHT-associated domain”
NAIP	“neuronal apoptosis inhibitory protein”
NALP	“NACHT and TP-1, LRR- and PYD-containing proteins”
NBD	“nucleotide-binding domain”
NCTC	“national collection of type cultures”
NF- κ B	“nuclear factor- κ B”/Eigenname eines Transkriptionsfaktors
NLR	„NOD-like“-Rezeptor
nm	Nanometer
NOD	„nucleotide-binding oligomerization domain protein”/ intrazelluläres Rezeptorprotein, ein PRR
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA	Kulturüberstände von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAM	“pathogen associated molecule”/pathogen assoziiertes Molekül
PBS	„phosphat buffered saline”/Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction”/Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PRR	“pattern recognition receptor”/Rezeptoren zur Erkennung von PAMs
PYD	„pyrin domain“
RIP2	„receptor-interacting proteins 2”
RNA	„ribonucleic acid”/Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	“Rosewell memorial institute medium”/ Nährmedium für Zelllinien
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
s.	siehe

S	Standard
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SDS	Sodium (Natrium)-dodecylsulfat
siRNA	„small interfering RNA“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBS	„Tris-buffered saline“
TIR	„Toll/interleukin 1“
TE	Tris-EDTA
TLR	„Toll-like“-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	„Tryptic soy broth“
TP-1	„telomerase-associated protein 1“
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	„volume per volume“/ Volumen pro Volumen
(w/v)	„weight per volume“/ Gewicht pro Volumen
∞	Unendlich

8.1 Symbole für den Nukleinsäurecode

A	Desoxyadenin	C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin	T	Desoxythymidin

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Harder und Herrn Prof. Dr. Schröder für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Frau Prof. Dr. Schmitz-Streit danke ich herzlich für ihr Interesse an dieser Arbeit.

Andrea, Silvia und Bianca aus dem Institut für Infektionsbiologie danke ich für die kompetente Unterstützung bei der Durchführung von Stimulationsexperimenten.

Für die kritische Durchsicht der Doktorarbeit danke ich Manfred Czapp, Ulrich Gerstel, Britta Hansmann, Kerstin Hinrichsen, Bente Köten und Anneke Weber.

Für den Spaß bei der Laborarbeit, die entspannte Atmosphäre, moralische Unterstützung, die vielen Tipps und Hilfeleistungen möchte ich mich ganz herzlich bei Anja, Anke, Bente, Birgit, Britta, Claudia B-M., Claudia N., Christel, Doris, Elvira, Felix, Gero, Graziella, Heilwig, Joachim, Jutta, Kai N., Kai W., Karin, Kerstin H., Kerstin S., Manfred, Marlis, Michael, Regine, Stephie, Uli und Zhihong bedanken. Außerdem möchte ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik für die freundliche Unterstützung danken.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir während meines Studiums immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eske Voß
Geburtsdatum: 02.08.1975
Geburtsort: Neumünster
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Derzeitige Anschrift: Auberg 39, 24106 Kiel

Schulbildung

1982-1986 Grund- und Hauptschule, Wasbek
1986-1992 Helene-Lange-Realschule, Neumünster,
Realschulabschluß
1992-1995 Elly-Heuss-Knapp-Schule, Neumünster,
Abitur mit allgemeiner Hochschulreife

Weiterer Bildungsweg

1996-2003 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Nov. 1998 Biologie-Vordiplom (Zoologie, Botanik, Physik, Chemie)
Mai 2003 Biologie-Diplom (Mikrobiologie, Biochemie, Zoologie)
2002-2003 Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie an der CAU (Prof. Dr. M. Thomm), Thema: „Expression und Charakterisierung von regulatorischen Proteinen aus *Pyrococcus*“
seit Nov. 2003 Beginn der Doktorarbeit an der Hautklinik der CAU (Herr PD Dr. Jürgen Harder; offizielle Betreuung durch Frau Prof. Dr. R. Schmitz-Streit), Thema: „Untersuchungen zur Rolle intrazellulärer Rezeptoren bei der Induktion von antimikrobiellen Peptiden durch Pathogen assoziierte Moleküle (PAMs)“

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder ganz, noch zum Teil an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie wurde, abgesehen von unten angegebenen Publikationen und Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Kiel, den

Eske Voß

Publikationen der vorliegenden Arbeit

Eske Voss, Jan Wehkamp, Kai Wehkamp, Eduard F. Stange, Jens M. Schröder and Jürgen Harder (2006): NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-Defensin-2. J Biol Chem 281: 2005-2011

Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

E. Voß, J.M. Schröder and J. Harder (2004): Induction of the Skin-Derived Antimicrobial Peptide Human Beta-Defensin-2 via NOD2/CARD15. J Invest Dermatol. 123(2):A204 (Abstract)

E. Voß, J.M. Schröder and J. Harder (2005): Gene expression of nucleotide-binding site and leucine-rich repeat (NBS-LRR) proteins in primary keratinocytes. Arch Dermatol Res. 296(9):P111 (Abstract)

E. Voß, J.M. Schröder and J. Harder (2005): Primary keratinocytes express nucleotide-binding site and leucine-rich repeat (NBS-LRR) proteins. J Invest Dermatol. 125(3):A254 (Abstract)

E. Voß, J.M. Schröder and J. Harder (2006): NOD2/CARD15 is essential for muramyl dipeptide (MDP)-mediated induction of human beta-defensin-2 (hBD-2) in primary keratinocytes. Exp Dermatol. 15(3):P071 (Abstract)

E. Voß, J.-M. Schröder and J. Harder (2006): NOD2/CARD15 Mediates Induction of Human Beta-Defensin-2 (hBD-2) in primary Keratinocytes. J Invest Dermatol. 126(3):A083 (Abstract)

E. Voß, J.-M. Schröder and J. Harder (2007): Analysis of NOD1 and NOD2 expression in human skin. Exp Dermatol. (Abstract, im Druck)