

**Untersuchungen zur hBD-2- und
hBD-3-Expression und -Regulation während
einer Candida-Ösophagitis**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Nadine Steubesand

Kiel 2008

Referent/in: Prof. Dr. Dr. h.c. T. C. G. Bosch
Korreferent/in: Prof. Dr. J. M. Schröder.
Tag der mündlichen Prüfung 23. Januar 2009
Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

Inhalt:

1	Einleitung	1
1.1	Immunsystem	1
1.2	Antimikrobielle Peptide	2
1.3	Defensine	3
1.3.1	α -Defensine	4
1.3.2	β -Defensine	5
1.4	Immunität des Verdauungstraktepithels	7
1.5	Candida-Ösophagitis	9
1.6	Signaltransduktionskaskaden	10
1.6.1	Toll-like Rezeptoren (TLRs)	10
1.6.2	Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R)	11
1.6.3	Tumor necrosis factor Rezeptor (TNFR)	11
1.6.4	Epidermal growth factor-Rezeptor (EGF-Rezeptor)	11
1.6.5	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK)-Kaskade	12
1.6.6	Nuclear Factor kappa B (NF κ B)	13
1.6.7	Activator Protein-1 (AP-1)	13
1.7	Regulation der Defensinexpression	14
1.8	Ziele der Arbeit	16
2	Material	17
2.1	Chemikalien und Reagenzien	17
2.2	Biochemikalien	18
2.2.1	Antikörper	18
2.2.2	Inhibitoren	19
2.2.3	Enzyme	19
2.2.4	Oligonukleotide	20
2.2.5	Kits	21
2.2.6	Zytokine	21
2.2.7	Wachstumsfaktoren	22
2.3	Biologisches Material	22
2.3.1	Mikroorganismen und Plasmide	22
2.3.2	Zelllinien	22
2.4	Verbrauchsmaterialien	22
2.5	Geräte	23
2.6	Puffer und Lösungen	24

Inhaltsverzeichnis

2.6.1	Medien	24
2.6.2	Puffer	25
2.6.3	Reagenzienrekonstitution	27
2.6.4	Gelrezepte	27
3	Methoden	29
3.1	Gewebeproben	29
3.1.1	Gewinnung von Gewebeproben	29
3.2	Zellbiologische Methoden	30
3.2.1	<i>Kultivierung von Candida albicans</i>	30
3.2.1.1	Herstellung von <i>Candida albicans</i> -Suspensionskulturen	30
3.2.1.2	Herstellung von <i>Candida albicans</i> -Überständen	30
3.2.2	Isolierung humaner polymorphonukleärer Zellen (PMZ) aus peripherem Blut	31
3.2.3	Kultivierung humaner eukaryotischer Zelllinien	31
3.2.3.1	Einfrieren und auftauen	31
3.2.3.2	Subkultivierung der OE21-Zellen	32
3.2.3.3	Stimulation der Zellen	32
3.2.3.4	Gewinnung von Überständen	33
3.2.4	siRNA-Transfektion von eukaryotischen Zellen	33
3.3	RNA-Isolation	34
3.3.1	Aufarbeitung der Gewebeproben	34
3.3.2	Aufbereitung der Zellen	34
3.3.3	Protokoll der RNA-Isolation	34
3.4	Konzentrationsbestimmung	35
3.4.1	RNA-Konzentrationsbestimmung	35
3.4.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	35
3.4.3	Protein-Konzentrationsbestimmung	36
3.5	Reverse Transkription (RT)	36
3.6	Generierung externer Standards	37
3.6.1	Polymerase Chain Reaction (PCR)	37
3.6.2	Aufreinigung der spezifischen PCR-Produkte	38
3.6.3	Klonierung und Transformation	38
3.6.4	Kolonie-PCR	39
3.6.4.1	Durchführung der Kolonie-PCR	39
3.6.5	Plasmidisolierung und Sequenzierung der Insert-tragenden Plasmide	40
3.6.6	Kalkulation der Plasmidkonzentration	40
3.6.7	Erstellung von Standardkurven	41
3.7	Real time RT-PCR	41

Inhaltsverzeichnis

3.7.1	Herstellung der Primer	42
3.7.2	PCR-Reaktion	42
3.7.3	Statistische Analysen	43
3.8	Zytokin Array	43
3.9	Immunhistochemische Färbungen	44
3.10	Fluoreszenz-Färbungen	45
3.11	Western Blot	45
3.11.1	Gelelektrophorese	45
3.11.2	Blotten	46
3.11.3	Entwicklung	46
3.11.4	Detektion	47
3.12	Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)	47
3.12.1	Isolierung von Kernproteinen	47
3.12.1.1	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese nach Laemmli	48
3.12.2	Radioaktive Markierung der Sonden	48
3.12.3	Gelshift	48
3.12.3.1	Native Protein-Gelelektrophorese	49
4	Ergebnisse:	50
4.1	Expressionsuntersuchungen im Ösophagusepithel	50
4.1.1	Antimikrobielle Peptide	50
4.1.2	Zytokine	52
4.1.3	Wachstumsfaktor-Rezeptoren	53
4.2	<i>In vitro</i> Versuche mit ösophagealen Zelllinien	54
4.2.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells in ösophagealen Zellen	54
4.2.2	Zytokine induzieren Defensine in Ösophaguszellen	55
4.2.3	Wachstumsfaktoren induzieren Defensine <i>in vitro</i>	56
4.2.4	Stimulation von OE21-Zellen mit vitalen <i>Candida albicans</i>	57
4.2.5	Überstände von <i>Candida albicans</i> -Kulturen induzieren Defensine	60
4.2.6	Kostimulation mit <i>Candida albicans</i> und polymorphonukleären Zellen (PMZ) induziert hBD-2 und hBD-3	61
4.2.7	Transkriptionsfaktor NF κ B wird durch <i>Candida albicans</i> -Infektion aktiviert	62
4.3	„Gel-shift“-Analysen	63
4.4	Zytokinanalyse	65
4.5	Identifizierung relevanter Signalkaskaden der Defensininduktion	67
4.5.1	NF κ B ist für hBD-2-Induktion nach <i>Candida albicans</i> -Infektion notwendig	67
4.5.2	EGF-Rezeptor ist für hBD-3-Induktion notwendig	69
4.5.3	MAP Kinasen sind für die Induktion von hBD-2 und hBD-3 von Bedeutung	71

5 Diskussion:	72
5.1 Die Defensinexpression ist in Ösophagusepithelzellen nach <i>Candida albicans</i> -Infektion erhöht	73
5.2 <i>In vitro</i> Analysen der <i>Candida albicans</i> -Infektion	73
5.3 Der Einfluss von PMZ und Zytokinen auf die Defensin-Induktion nach <i>Candida albicans</i> -Infektion	75
5.4 Die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 sind an der Defensin-Induktion nach <i>Candida albicans</i> -Infektion beteiligt	77
5.5 Analyse der NF κ B-Relevanz für die Defensin-Induktion	78
5.6 Analyse der Relevanz von EGFR- und AP-1-abhängigen Signalkaskaden	79
6 Zusammenfassung	81
7 Summary	82
8 Literaturverzeichnis	83
9 Abkürzungsverzeichnis	91
10 Danksagung	94
11 Lebenslauf	95
12 Erklärung	96

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem ist eine komplexe Einheit von lymphoiden Organen, Zellen, humoralen Faktoren und Zytokinen, die miteinander interagieren, um den Organismus vor Infektionen durch Krankheitserreger (Pathogene) zu schützen. Dies gelingt nur, da das Immunsystem in der Lage ist zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden. Es wird in zwei Teile gegliedert — das angeborene und das erworbene Immunsystem. Die beiden Teile unterscheiden sich in der Geschwindigkeit und Spezifität ihrer Reaktion, gleichzeitig finden jedoch auch zahlreiche Wechselwirkungen zwischen ihnen statt. Die angeborene Immunität umfasst physikalische, chemische und mikrobiologische Barrieren, aber auch zelluläre und molekulare Faktoren (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Komplement-System, Zytokine und akute Phase Proteine), die eine sofortige Wirtsverteidigung gewährleisten. Die angeborene Immunität arbeitet unspezifisch, weshalb manchmal normales Gewebe beschädigt wird. Ihr Vorteil liegt darin, dass sie stets aktiv oder sofort induzierbar ist. Die einzelnen Faktoren der angeborenen Immunität arbeiten effektiv zusammen und können sich gegenseitig verstärken (Parkin & Cohen, 2001).

Die erworbene Immunität ist gekennzeichnet durch Antigen-spezifische Reaktionen, die durch B-Lymphozyten mit Unterstützung der T-Lymphozyten vermittelt werden. Sie arbeitet sehr spezifisch, bedarf jedoch einer gewissen Vorlaufzeit, bevor ihre maximale Effektivität erreicht ist. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem verfügt das erworbene Immunsystem über ein Gedächtnis, wodurch wiederkehrende Infektionen rasch und äußerst effektiv bekämpft werden können.

Nach einer Infektion besteht die zentrale Aufgabe der angeborenen Immunität in der Aktivierung von Neutrophilen und ihrer Entsendung an die Infektionsstelle, um Pathogene durch Phagozytose abzutöten. Aktivierte Makrophagen setzen Zytokine frei, welche die Teilung von myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark stimulieren, was letztendlich zur neutrophilen Leukozytose führt. Die Erkennung von Pathogenen erfolgt über spezifische Strukturen auf den Mikroorganismen, so genannte „pathogen-associated-molecular patterns“ (PAMPs), die von ‚Pattern-Recognition Rezeptoren‘ (PRR) auf den Immunzellen erkannt werden. Gleichzeitig induziert die Bindung von PAMPs an PRRs die Aktivierung von Faktoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Dempsey *et al.*, 2003).

Nachdem Pathogene von Rezeptoren erkannt worden sind, werden u.a. Zytokine aktiviert. Zytokine sind kleine Botenmoleküle die von einer Zelle sezerniert werden und als auto- oder parakrine Faktoren wirken. Sie induzieren intrazelluläre Signalwege, indem sie an

spezifischen Oberflächenrezeptoren binden. Somit bewirken sie lokale und systemische Effekte und führen zur Entzündungsreaktion — kurz „akute Phase“ genannt. Systemische Effekte sind beispielsweise Veränderungen in der Temperatur, dem Blutfluss oder der Zusammensetzung der Serumproteine des Organismus. Lokal bewirken die akute Phase-Zytokine die Aktivierung des Komplement-Systems, die Zerstörung von Pathogenen und die Beseitigung von apoptotischen Zellen. Zytokine, die von Leukozyten produziert werden und hauptsächlich auf andere weiße Blutzellen wirken, werden Interleukine genannt. Solche, die chemotaktische Aktivität besitzen, werden Chemokine genannt. Chemokine werden von den meisten Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder bakteriellen Stimuli produziert. Es handelt sich bei ihnen um kleine sezernierte Moleküle, denen eine Schlüsselrolle bei der Leukozytenbewegung zukommt. Durch ihre Chemotaxis sind sie in der Lage die gerichtete Bewegung von Zellen herbei zu führen. Chemokinrezeptoren findet man auf allen Leukozyten (Parkin & Cohen, 2001).

1.2 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide sind Teil der angeborenen Immunität und werden als Polypeptide mit weniger als 100 Aminosäuren definiert (Ganz & Lehrer, 1994). Mehr als 100 Peptide mit antimikrobieller Aktivität konnten bisher in vielen Spezies identifiziert werden, darunter Pflanzen, Amphibien, Insekten, Vögel und Säugetiere (Dimopoulos *et al.*, 1997, Ganz & Lehrer, 1998, Schröder, 1999).

Die Gene der einzelnen Peptidfamilien findet man innerhalb eines Organismus in eng begrenzten Genabschnitten – sogenannten Clustern. Da man in unterschiedlichen Säugetierspezies strukturell ähnliche antimikrobielle Peptidgene auf evolutionär verwandten chromosomalen Segmenten findet, wird vermutet, dass die Gene der Säugetierpeptide auf ein gemeinsames Vorläufergen zurückzuführen sind.

Die meisten antimikrobiellen Peptide besitzen amphiphilen Charakter. Die Wechselwirkung des kationischen Teils der Peptide mit den anionischen Phospholipidgruppen der Prokaryontenmembran führt zur Porenbildung in der Membran, was letztendlich zur Zelllyse der Bakterien führt. Die antimikrobielle Aktivität der einzelnen Peptide liegt im mikromolaren Bereich. Ihr Wirkspektrum umfasst Bakterien, Pilze, einige Parasiten und Viren, wobei individuelle Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen den einzelnen antimikrobiellen Peptiden bestehen. Ihre Expression ist in der Regel induzierbar, es sind aber auch konstant exprimierte antimikrobielle Peptide bekannt (Bevins 2003).

Die chemische Struktur der Peptide ist unterschiedlich und wurde daher auch als Grundlage für Klassifizierungen verwendet (Boman, 1995). Bei Säugetieren unterteilt man sie auf Grund ihrer Genfamilien, so können die meisten humanen antimikrobiellen Peptide in zwei große

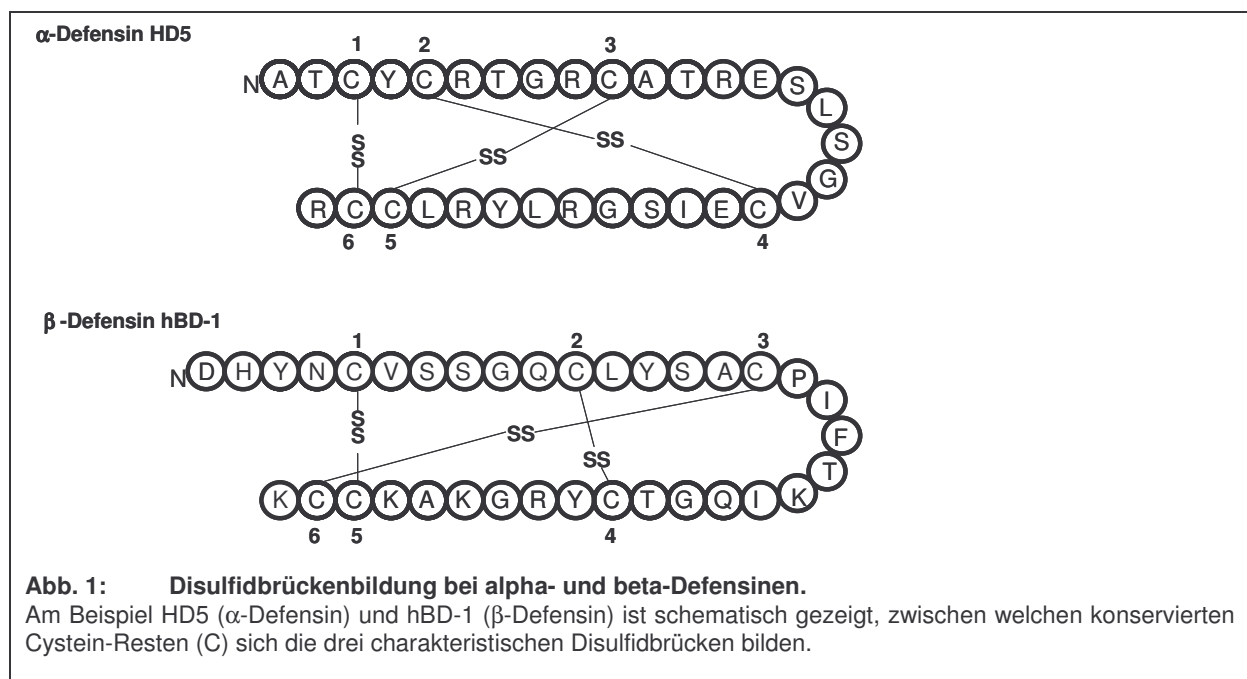
Familien unterschieden werden – die Defensine (Lehrer & Ganz, 2002) und die Cathelicidine (Lehrer & Ganz 2002b).

Cathelicidine sind lineare, α -helikale Peptide ohne Cysteinreste. Beim Menschen konnte bisher nur das Cathelicidin LL-37/hCAP-18 aus myeloiden Zellen identifiziert werden (Agerberth *et al.*, 1995). Antimikrobielle Peptide mit einer flachen, dimeren β -Faltblatt Struktur werden als Defensine bezeichnet. Sie werden hauptsächlich von epithelialen Geweben und von Leukozyten exprimiert (Lehrer & Ganz, 2002).

1.3 Defensine

Die humanen Defensine sind auf Chromosom 8p23 kodiert (Linzmeier *et al.*, 1999). Unter Pflanzen- und Säugetier-Defensinen konserviert ist die Unterteilung der kodierenden Gen-Sequenz in zwei Exon- und eine Intron-Region (Harder *et al.*, 2000).

Die humanen Defensine bestehen aus 28 bis 44 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von 3,5 bis 4,5 kDa. Charakteristisch für alle Defensine sind sechs konservierte Cysteinreste, die untereinander Disulfidbrücken bilden, die Resistenz gegenüber Proteolyse erhöhen und die Peptide stabilisieren (Ganz & Lehrer, 1994). Auf Grund der gebildeten Disulfidbrücken unterteilt man die Defensine in zwei Gruppen – α - und β -Defensine. α -Defensine bilden Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen: C1-C6, C2-C4, C3-C5 (Selsted & Harwig, 1989) und β -Defensine zwischen den Cysteinen C1-C5, C2-C4, C3-C6 (Tang & Selsted, 1993) (Abb. 1).



1.3.1 α -Defensine

Bisher wurden sechs α -Defensine beim Menschen identifiziert — die humanen neutrophilen Peptide (HNP) 1-4 und die humanen Defensine (HD) 5 und 6. α -Defensine werden als 93-100 Aminosäuren lange Pre-Propeptide synthetisiert. Diese umfassen eine, aus 19 Aminosäuren bestehende, Signalsequenz und ein, aus 41-51 Aminosäuren bestehendes, anionisches Prosegment. Die Pre-Region wird von einer Signalpeptidase abgespalten und das Propetid in den Granulozyten bzw. den Paneth-Zellen weiter prozessiert (Beckloff & Diamond, 2008).

Die HNP 1-4 wurden aus Neutrophilen isoliert. Sie stellen etwa 5 % des Gesamtproteingehalts der Neutrophilen dar (Ganz *et al.*, 1985) und sind für einen Großteil der Sauerstoff-abhängigen Abtötung von phagozytierten Mikroorganismen verantwortlich (Chertov *et al.*, 1996). HNP1 und HNP4 werden von den Genen DEFA1 bzw. DEFA4 kodiert. HNP3 entsteht aus einer Einzelbasensubstitution des DEFA1 Gens, während HNP2 aus der posttranslationalen Deletion des Amino-Terminus von HNP1 oder HNP3 entsteht (Ganz & Lehrer, 1998). In den sich entwickelnden Granulozyten werden die Propetide durch proteolytische Enzyme weiter prozessiert, um das funktionale Peptid herzustellen, welches anschließend in die Granulas verpackt wird (Beckloff & Diamond, 2008). Die antimikrobielle Aktivität von HNP1 und HNP2 umfasst Gram-positive und Gram-negative Bakterien und umhüllte Viren. Die Aktivität gegenüber Hefen, wie *Candida albicans*, ist jedoch nur gering.

In der Basis der Krypten des Dünndarms befinden sich die Panethzellen, aus denen HD5 (Jones & Bevins, 1992) und HD6 (Jones & Bevins, 1993) isoliert wurden. HD5 und HD6 werden als Propeptide in sekretorischen Vesikeln der Panethzellen oder den Granulozyten des Dünndarmepithels gelagert. Prozessierungsvorgänge erfolgen über Spaltung durch Panethzell-Trypsin oder die Metalloproteinase Matrylin, nach Stimulation durch Mikroorganismen (Beckloff & Diamond, 2008). HD5 zeigt bereits im nanomolaren Bereich antimikrobielle Aktivität gegenüber *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* und *Candida albicans*. Letztere ist nicht in der Lage die Freisetzung von HD5 und HD6 zu induzieren, daher spielen die alpha-Defensine bei *Candida albicans*-Infektionen nur eine untergeordnete Rolle (Schneider *et al.*, 2005) und wurden in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

1.3.2 β -Defensine

Vier β -Defensine wurden bisher beim Menschen identifiziert. Im Gegensatz zu den α -Defensinen besitzen sie keine Proregion und werden durch eine Signalpeptidase zum funktionalen Protein prozessiert. Die Regulation der Expression erfolgt alleine auf der Basis der Transkription (Beckloff and Diamond, 2008).

Das erste humane beta-Defensin (hBD-1) (Bensch *et al.*, 1995) wurde aus Blutplasma isoliert und auf Grund seiner Homologie zu den Rinder β -Defensinen (TAP und LAP (Diamond *et al.*, 1991, Schonwetter *et al.*, 1995)) als hBD-1 bezeichnet. HBD-1 wird ubiquitär exprimiert, z.B. in Epithelzellen (Wehkamp *et al.*, 2004) und in Keratinozyten (Harder *et al.*, 2004), und zeigt antimikrobielle Wirksamkeit im mikromolaren Bereich gegenüber Gram-negativen Bakterien wie z.B. *Escherichia coli*, aber nicht gegenüber Gram-positiven Bakterien (Schneider *et al.*, 2005). Die Expression von hBD-1 wird in der Regel als konstitutiv beschrieben, also nicht induzierbar durch Zytokine oder mikrobielle Stimuli, wobei es konstant auf sehr hohem Expressionsniveau produziert wird. Es sind jedoch auch Studien bekannt, bei denen die hBD-1-Expression durch bakterielle oder fungale Stimuli induziert wurde (Sorensen *et al.*, 2005, Lu *et al.*, 2006).

Das zweite menschliche β -Defensin wurde 1997 von Harder *et al.* aus Hautschuppen von Psoriasis-Patienten isoliert und zeigt ebenfalls große Homologien zu den Rinder β -Defensinen und zu hBD-1. HBD-2 besitzt hohe antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Gram-negativen Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und Hefen wie *Candida albicans*, dagegen wirkt es nur bakteriostatisch gegenüber dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus*. Beim Menschen konnte hBD-2 in verschiedenen Epithelien, wie den Keratinozyten (Harder *et al.*, 1997) oder den Magen- und Speiseröhren-Epithelien (Kiehne *et al.*, 2005) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu hBD-1 ist die basale Expression von hBD-2 nur gering, dafür kann seine Expression durch Entzündungsfaktoren wie IL-1 β (Mathews *et al.*, 1999) und IL-1 α (O'Neil *et al.*, 1999), oder durch Mikroorganismen (z.B. *Pseudomonas aeruginosa* (Harder *et al.*, 2000)) deutlich gesteigert werden. Zudem wirkt hBD-2 chemotaktisch auf T-Zellen und dendritische Zellen (Yang *et al.*, 1999).

HBD-3 wurde ebenfalls erstmals aus Hautschuppen von Psoriasis-Patienten isoliert (Harder *et al.*, 2001). Zeitgleich konnten Garcia *et al.* (Garcia *et al.*, 2001) und Jia *et al.* (Jia *et al.*, 2001) es mittels Sequenzanalysen des humanen Genoms als Homolog zu hBD-1 und hBD-2 (43%) nachweisen. Wie hBD-2 kann hBD-3 durch mikrobielle Stimuli (z.B. *Pseudomonas aeruginosa* (Harder *et al.*, 2004), *Staphylococcus aureus* (Sayama *et al.*, 2005)) oder

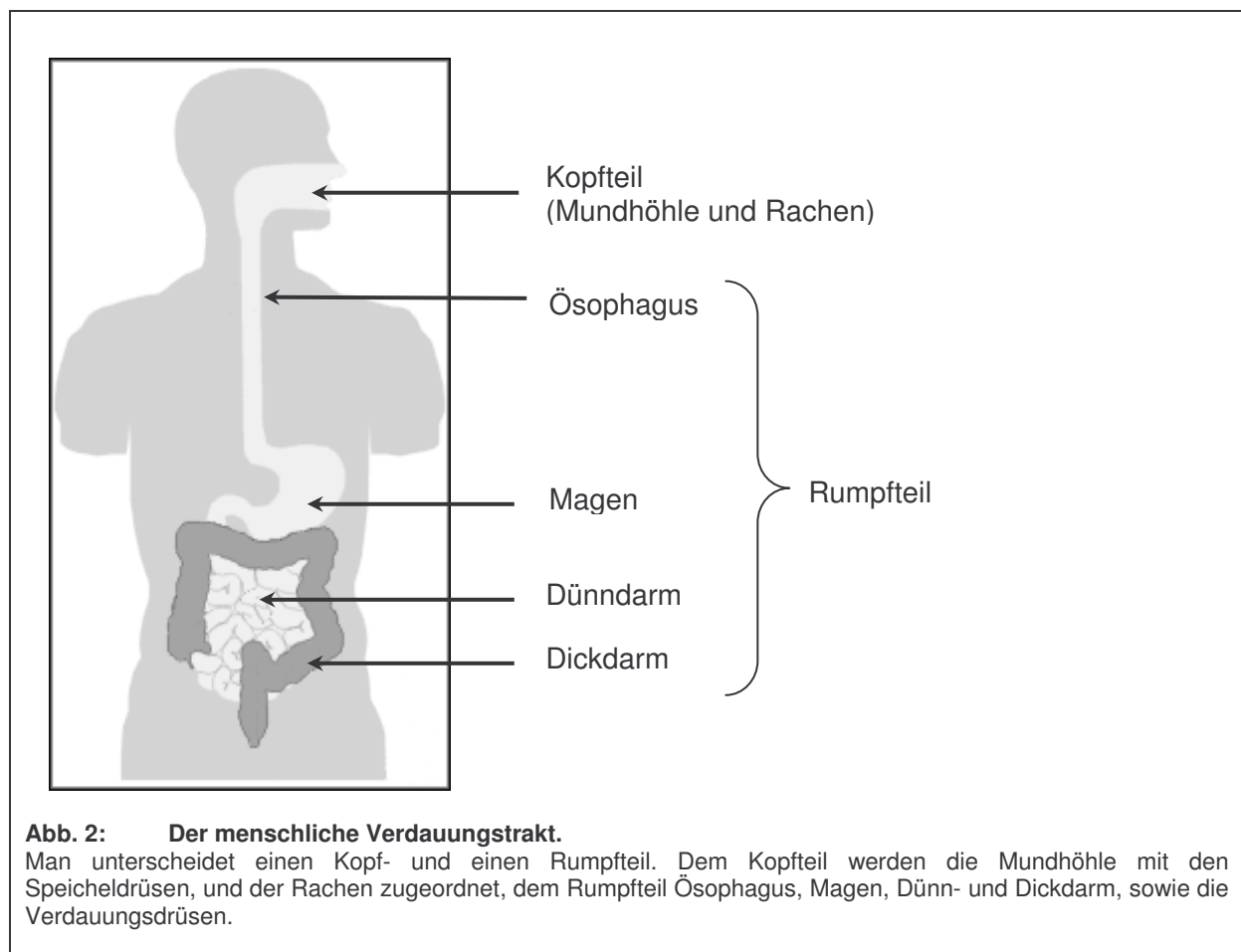
Entzündungsfaktoren (z.B. $\text{TGF}\alpha$ (Sorensen *et al.*, 2003), $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$) induziert werden. Trotz der hohen Sequenzhomologie unterscheidet sich hBD-3 in entscheidenden Funktions- und Wirkungsprinzipien von den anderen humanen β -Defensinen. So besitzt hBD-3 nicht nur antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Gram-negativen Bakterien und Pilzen, wie *Candida albicans*, sondern auch gegenüber Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus*. Ursache dafür könnte die unterschiedliche Struktur der Peptide sein. NMR Analysen belegen, dass hBD-3 als Dimer wirkt (hBD-1 und 2 als Monomer) und über eine Nettoladung von +11 verfügt, während bei hBD-1 und hBD-2 die Nettoladung +4 bzw. +6 beträgt (Shibli *et al.*, 2002). Aber auch seine Unempfindlichkeit gegenüber hohen Salzkonzentrationen könnte in diesem Zusammenhang wichtig sein. Des Weiteren wird hBD-3 auch in nicht epithelialen Geweben wie dem Herz- und Skelettmuskel exprimiert und es induziert die Migration von Monozyten, aber nicht von Neutrophilen (Garcia *et al.*, 2001).

Als bisher letztes humanes β -Defensin wurde hBD-4 durch Sequenzanalysen des humanen Genoms identifiziert, obwohl es nur 20 bis 25%ige Sequenzhomologie zu hBD-1, hBD-2 und hBD-3 zeigt. Die höchste Organexpression findet sich in Hoden und Magen (Antrum) und es kann, wie hBD-2 und hBD-3, durch Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pneumoniae*) und Entzündungsfaktoren induziert werden (Harder *et al.*, 2004). HBD-4 zeigt antimikrobielle Aktivität im mikromolaren Bereich gegenüber *Staphylococcus carnosus* und *Pseudomonas aeruginosa*, und wirkt, wie hBD-3, chemotaktisch für Monozyten, aber nicht für Eosinophile und Neutrophile (Garcia *et al.*, 2001b).

1.4 Immunität des Verdauungstraktepithels

Die Mukosa des Verdauungstraktes ist für die Nahrungsresorption und für die Trennung zwischen zellulärem und intestinalen Milieu verantwortlich. Der Verdauungstrakt stellt somit die größte Oberfläche für Wechselwirkungen zwischen dem Organismus und Mikroorganismen dar, dennoch sind Infektionen durch Pathogene relativ selten.

Funktionell unterscheidet man den Verdauungstrakt in einen Kopf- und einen Rumpfteil (Abb. 2). Dem Kopfteil zugeordnet werden die Mundhöhle mit ihren Speicheldrüsen, sowie der mittlere und untere Teil des Rachens (Schlund). Zum Rumpfteil zählt man Speiseröhre (Ösophagus), Magen, Dünndarm, Dickdarm und die Verdauungsdrüsen.



Die einzelnen Teile des Verdauungstraktes werden von einer variierenden Zahl an Mikroorganismen besiedelt. In der Mundhöhle finden sich etwa 200 verschiedene Bakterienspezies (Dunsche *et al.*, 2001), während der menschliche Ösophagus hauptsächlich von *Candida albicans* und *Streptococcus viridans* besiedelt wird. Der Magen und der obere Dünndarm (Duodenum) sind relativ keimarm, sie werden von etwa 10^1 – 10^3

Mikroorganismen/ml bevölkert (z.B. *Helicobacter pylori*). Im Verlauf des Dünndarms (Jejunum und Ileum) steigt die Keimzahl auf 10^4 – 10^8 /ml. Hier findet man unter anderem Mikroorganismen wie Lactobazillen, *Escherichia coli*, Streptokokken und Bacteroides. Dagegen wird das Dickdarmlumen von einer großen und komplexen Bakterienpopulation bevölkert (etwa 10^{12} Organismen pro Gramm Inhalt), wie z.B. Bacteroides, *Escherichia coli*, Streptococci, Clostridien, Lactobacillen, Pseudomonas, Eubacteria und Hefen (Savage, 1987).

Um das Wachstum der diversen Mikroorganismen unter Kontrolle zu halten, ist ein wirkungsvolles Abwehrsystem notwendig. Die relative Sterilität des Magens wird z.B. durch den niedrigen pH-Wert der Magensäure (pH 1-3) und die peristaltische Aktivität erreicht. Aber auch die anderen Teile des Verdauungstraktes besitzen effektive Verteidigungsmechanismen, die eine übermäßige Besiedlung des Epithels und ein Eindringen in die subepitheliale Bereiche verhindern. Zum einen sind das die Mechanismen des „klassischen Immunsystems“. Hier kommt es nach Infektionen zur vermehrten Freisetzung von immunkompetenten Zellen, der Aktivierung des erworbenen Immunsystems und der humoralen und zytotoxischen Antwort von B- und T-Lymphozyten in Reaktion auf Antigene. Zum anderen hat man in den letzten Jahren herausgefunden, dass auch das Epithel des Verdauungstraktes selbst eine wichtige und aktive Rolle in der angeborenen Immunität spielt. Die Mukus-Schicht, welche auf der Oberfläche der Epithelzellen aufliegt, stellt nicht nur eine physikalische Barriere gegen die Mikroorganismen und Toxine dar, sondern sie enthält zudem lösliches Immunglobulin A und Lysozym. Beide besitzen antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien (Mahida *et al.*, 1997). Auch in Körperflüssigkeiten, den Organellen der phagozytischen Zellen und den Epithelzellen selbst finden sich Peptide mit antimikrobieller Aktivität, wie z.B. Defensine. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Epithelien in Reaktion auf mikrobielle Pathogene unterschiedliche antimikrobielle Peptide freisetzen können, welche die Membran der Pathogene zerstören und so die Epithelien und Organellen vor systemischen Infektionen schützen können (O’Neil *et al.*, 2000).

Bezugnehmend auf die oben angeführte z.T. sehr hohe Bakteriendichte des Verdauungstraktes und die kurze Verdopplungszeit einiger Bakterienspezies wird klar, dass das erworbene Immunsystem nicht schnell und effektiv genug auf eine eventuelle Infektion reagieren könnte. Daher wurde den Mechanismen des angeborenen Immunsystems zunehmende Bedeutung zugesprochen. Sie stellen ein sofort aktives und breit wirksames Verteidigungssystem dar, das schneller arbeitet, als die Wachstumsrate der pathogenen Mikroorganismen und somit die erste Verteidigungsbarriere gegen die Mikroorganismen bildet, bis die erworbene Immunität übernehmen kann (Dempsey *et al.*, 2003).

1.5 Candida-Ösophagitis

Der Ösophagus ist ein 20-30 cm langer Muskelschlauch, der den Mund mit dem Magen verbindet. Er besitzt den für den gesamten Verdauungstrakt charakteristischen Aufbau aus Mukosa, Submukosa und Muskelschicht. Die innere Schleimhaut (Mukosa) besteht aus unverhorntem Plattenepithel, dem eine lockere Bindegewebsschicht (Submukosa) aufliegt. Die sich anschließende Muskelschicht (Muscularis) besteht aus einer inneren Ringmuskelschicht und einer äußeren Längsmuskelschicht. Durch abwechselnde abschnittsweise verlaufende Kontraktionen der beiden Muskelschichten (Peristaltik) wird die Nahrung in Richtung Magen transportiert. Der Beginn des Ösophagus im Rachen, als auch das Ende vor dem Magen, werden von einem ringförmigen Schließmuskel (Ösophagus-Sphinkter) begrenzt. Der untere Ösophagus-Sphinkter verhindert zum einen den Rückfluss der Nahrung, zum anderen das Aufsteigen von saurem Magensaft in den Ösophagus. Ein gestörter Verschlussmechanismus führt zu einem Rückfluss des aggressiven Magensaftes (Reflux) in den Ösophagus und zu einer Schädigung und Entzündung der Schleimhaut (Sodbrennen). Bei chronischer Reflux-Erkrankung kann es langfristig zu einer Veränderung der distalen Schleimhaut kommen (Hellmig & Fölsch, 2007).

Eine Entzündung des Ösophagusepithels kann auch auf Pilzinfektionen zurückzuführen sein, die durch den Hefepilz *Candida albicans* hervorgerufen werden. Bei *Candida albicans* handelt es sich um einen opportunistischen Kommensalen des Menschen. Daraus ergibt sich, dass in fast jedem menschlichen Verdauungs-, Harn- und Genitaltrakt sich Vertreter dieser Spezies finden, die bei gesunden Individuen jedoch äußerst selten Infektionen hervorrufen. Ist das Immunsystem allerdings durch Chemotherapien, Bestrahlungen (Radiotherapie) oder HIV-Infektionen geschwächt oder die konkurrierende Flora durch Antibiotika-Behandlung beseitigt, kann *Candida albicans* das Wirtsgewebe überbesiedeln und eindringen (Baehr & McDonald, 1994).

Candida albicans wachsen als Blastosporen oder als filamentöse Hyphen. Letztere stellen die invasive Form der Hefe dar, weshalb man diese innerhalb der Epithelien findet, während Blastosporen hauptsächlich auf der Oberfläche dieser zu finden sind. Wichtig für die Adhäsion und Invasion in Wirtszellen sind Adhäsine, wie das „Hyphal wall protein 1“ (Hwp1) oder das „agglutinin-like sequence 1 protein“ (Als1p), welche die Adhäsion an Epithel-, Endothelzellen und mononukleäre Leukozyten vermitteln, jedoch nur während des Hyphenwachstums produziert werden. Zusätzlich besitzt *Candida albicans* lytische Proteine (SAPs), die die Oberfläche der Epithelzellen verdauen und so das Eindringen in die Zellen ermöglichen. Alternativ induzieren die Hefen die eigene Endozytose in Epithelzellen, um in Zellen zu gelangen (Filler & Sheppard, 2006).

Die Penetration des Epithels beginnt in den ersten Stunden nach Schleimhautkontakt mit dem Erreger (Bernhardt *et al.*, 2001) und äußert sich klinisch im weiteren Verlauf sehr variabel als Soorösophagitis mit Schluckbeschwerden, atypischen Brustschmerzen und einem Erythem der Schleimhaut mit endoskopisch sichtbaren klassischen weißen Läsionen, oftmals im oberen Drittel des Ösophagus (Goff, 1998). *C. albicans* gilt als der häufigste Erreger humaner Pilzinfektionen (Tortoramo *et al.*, 2006). Wiederkehrenden Infektionen der Mundhöhle oder der oberflächliche Befall der Mukosa durch *Candida albicans* sind für Patienten mit geschwächtem Immunsystem belastend, meist aber kontrollierbar. Gelangt *Candida albicans* jedoch in tiefere Epithelschichten oder sogar in das Blut, kann die Infektion innere Organe lebensbedrohlich befallen.

1.6 Signaltransduktionskaskaden

Die Infiltration der Epithelien durch Pathogene wie *Candida albicans* wird über Rezeptoren (PRRs) detektiert, die konservierte chemische Strukturen (PAMPs) erkennen. Wichtige PRRs der *Candida albicans*-Detektion sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die C-Typ Lektin Rezeptoren. Bei den C-Typ Lektin Rezeptoren handelt es sich hauptsächlich um Membran-gebundene Rezeptoren, die Polysaccharidstrukturen von *Candida albicans* erkennen. So erkennt Dectin-1 β -Glucan, wohingegen der Makrophagen Mannose Rezeptor „N-linked“-Mannan detektiert (Filler, 2006).

1.6.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die TLRs sind Zellmembran assoziierte oder intrazelluläre Rezeptoren der Familie der Typ1 Transmembran-Rezeptoren. Sie bestehen aus einer extrazellulären Leuzin-reichen (LRR) Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) homologen Domäne. Während die LRR Domäne für die Ligandenbindung verantwortlich ist, vermittelt die TIR Domäne die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen TLR-Proteinen untereinander und TLR-Proteinen mit downstream Signaltransduktionsmolekülen. Bisher wurden 10 Mitglieder der TLRs im Menschen identifiziert, die alle von spezifischen Liganden gebunden werden (Kawai & Akira, 2006). Für die Detektion von *Candida albicans* von Bedeutung sind beispielsweise der TLR2, er erkennt Phospholipomannan (Ferwerda *et al.*, 2008), der TLR4, welcher „O-linked“-Mannan detektiert (Weindl *et al.*, 2007) oder der TLR6 (Zymosandetektion)(Netea *et al.*, 2008).

Nach der Erkennung von PAMPs aktivieren die TLRs intrazelluläre, konservierte Signalwege, die in der Aktivierung von NF κ B und AP-1 resultieren und die Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-12 induzieren. Zusätzlich initiieren

TLRs auf diese Weise die Reifung dendritischer Zellen (DCs), wodurch sie die erworbene Immunität mit der angeborenen Immunität verknüpfen.

1.6.2 Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R)

Die Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1Rs) gehören, wie die TLRs, zur Familie der Typl Transmembran-Rezeptoren und spielen für die angeborene Immunität und bei Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle (Dunne & O'Neill, 2003). Charakteristisch für die Mitglieder der IL-1R Subfamilie sind Immunglobulin ähnliche Strukturen in der extrazellulären Domäne, die spezifische IL-1 verwandte Zytokine binden und in die unterschiedlichsten immunologischen und inflammatorischen Prozesse involviert sind. Wie bei den TLRs ist die intrazelluläre Domäne durch die TIR Domäne charakterisiert. Die Bindung von IL-1 an dem IL-1RI resultiert in der Assoziation des Rezeptors mit einem Akzessorischen Protein, wodurch ein funktionaler Rezeptorkomplex gebildet wird. Dieser führt über weitere Hilfsmoleküle zur Aktivierung und nukleären Translokation von NFκB (Verstrepen *et al.*, 2008).

1.6.3 Tumor necrosis factor Rezeptor (TNFR)

Tumor necrosis factor (TNF) bindet sowohl an TNFR1, als auch an TNFR2. Beide gehören zu der TNF Rezeptor Superfamilie, die z.T. wichtige Funktionen bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems haben (Aggarwal, 2003). Alle Mitglieder dieser Familie besitzen 6 Cystein-reiche Regionen in der extrazellulären Domäne. Charakteristisch für die zytoplasmatischen Domäne des TNFR1 ist eine „Death Domäne“ — Bindungsstelle eines Signalmoleküls. Die Aktivierung des TNFR resultiert in der Aktivierung und nukleären Translokation von NFκB (Verstrepen *et al.*, 2008).

1.6.4 Epidermal growth factor-Rezeptor (EGF-Rezeptor)

Der EGF-Rezeptor ist ein für das Zellwachstum und die Zellproliferation wichtiger Rezeptor. Auf Grund seiner zahlreichen Liganden und der Liganden-unabhängigen Aktivierung durch andere Signalkaskaden wirkt er als Vermittler zwischen den unterschiedlichsten Signalwegen und als Schaltstelle des zellulären Kommunikationsnetzwerkes. Er gehört zur Superfamilie der membranständigen Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen (RPTK). Zu dieser Familie gehören ebenfalls der PDGFR, VEGFR, FGFR oder der InsR. Man unterscheidet vier weitgehend homologe menschliche EGF-Rezeptoren, die eine Familie bilden, wobei der EGFR der am besten untersuchte Rezeptor dieser Familie ist. Die Aktivierung der

Rezeptoren der EGFR-Familie erfolgt durch Bindung ihrer Liganden, zu denen EGF, TGF α , HB-EGF, Amphiregulin und Betacellulin gehören (Hackel PO *et al.*, 1999). Die Liganden werden als glykosylierte, in der Membran verankerte Vorstufen synthetisiert. Aus diesen Vorläufern wird durch Proteolyse der lösliche Wachstumsfaktor freigesetzt, der dann parakrin (an Rezeptoren anderer Zellen) wirkt (Prenzel *et al.*, 2001). Der Proteolysevorgang wird durch eine Familie von transmembranären Metalloproteasen reguliert, die z.B. durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, aber auch durch tumorfördernde Phorbolster aktiviert werden. Dabei werden durch EGFR-Aktivierung eine Reihe von Signalwegen in Gang gesetzt, die sich untereinander kreuzen und überlappen können und so im Endeffekt zu Genexpression, Zellteilung, Differenzierung, Steigerung der Zellbeweglichkeit und Inhibition der Apoptose führen. Die wichtigsten Substrate des EGFRs sind die MAPK-Kaskade Erk (siehe unten), die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und die PLC- γ (Phospholipase C- γ).

1.6.5 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK)-Kaskade

Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPKs) sind intrazelluläre Serin/Threonin Kinasen, die von RPTK in Assoziation mit G-Proteinen aktiviert werden. Sie bilden ein regulatorisches Netzwerk von Kinasen, welches mitogene und extrazelluläre Stimuli — von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Adhäsionsfaktoren — mit zytoplasmatischen und nukleären Effektoren verknüpft. Dabei regulieren sie unter anderem Wachstum, Differenzierung Überleben und Bewegung von Zellen. Die MAPK-Kaskaden teilen strukturell verwandte Komponenten, steuern jedoch spezifische biologische Prozesse. Die Erk- („extracellular signal-regulated kinase“), p38- (SAPK2 = „stress activated protein kinase“) und JNK- (= „c-jun N-terminal kinase“ = SAPK1) Kaskade sind in Säugetierzellen am besten untersucht. Zellulärer Stress, bakterielle Infektionen und proinflammatorische Zytokine aktivieren die p38- und die JNK-Kaskaden. Die Erk-Kaskade wird über mitogene Wachstumsfaktoren aktiviert. MAP-Kaskaden bestehen aus einer MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK, z.B. Raf), einer MAP Kinase Kinase (MAPKK, z.B. Mek) und einer MAP Kinase (MAPK, z.B. Erk). Durch Kopplung dieser drei Kinasen wird eine Signalamplifikation erreicht und die Zelle kann sensitiver auf externe Stimuli reagieren (Chang & Karin, 2001). MAPK-Kaskaden spielen auch bei *C. albicans*-Infektionen eine wichtige Rolle. So ergaben Analysen einer Maus Makrophagen Zelllinie, welche nicht in der Lage war *C. albicans*-Zellen abzutöten, dass bei dieser Zelllinie keine Signaltransduktionsprozesse über die p38 MAP Kinase stattfinden (Du *et al.*, 2005).

1.6.6 Nuclear Factor kappa B (NF κ B)

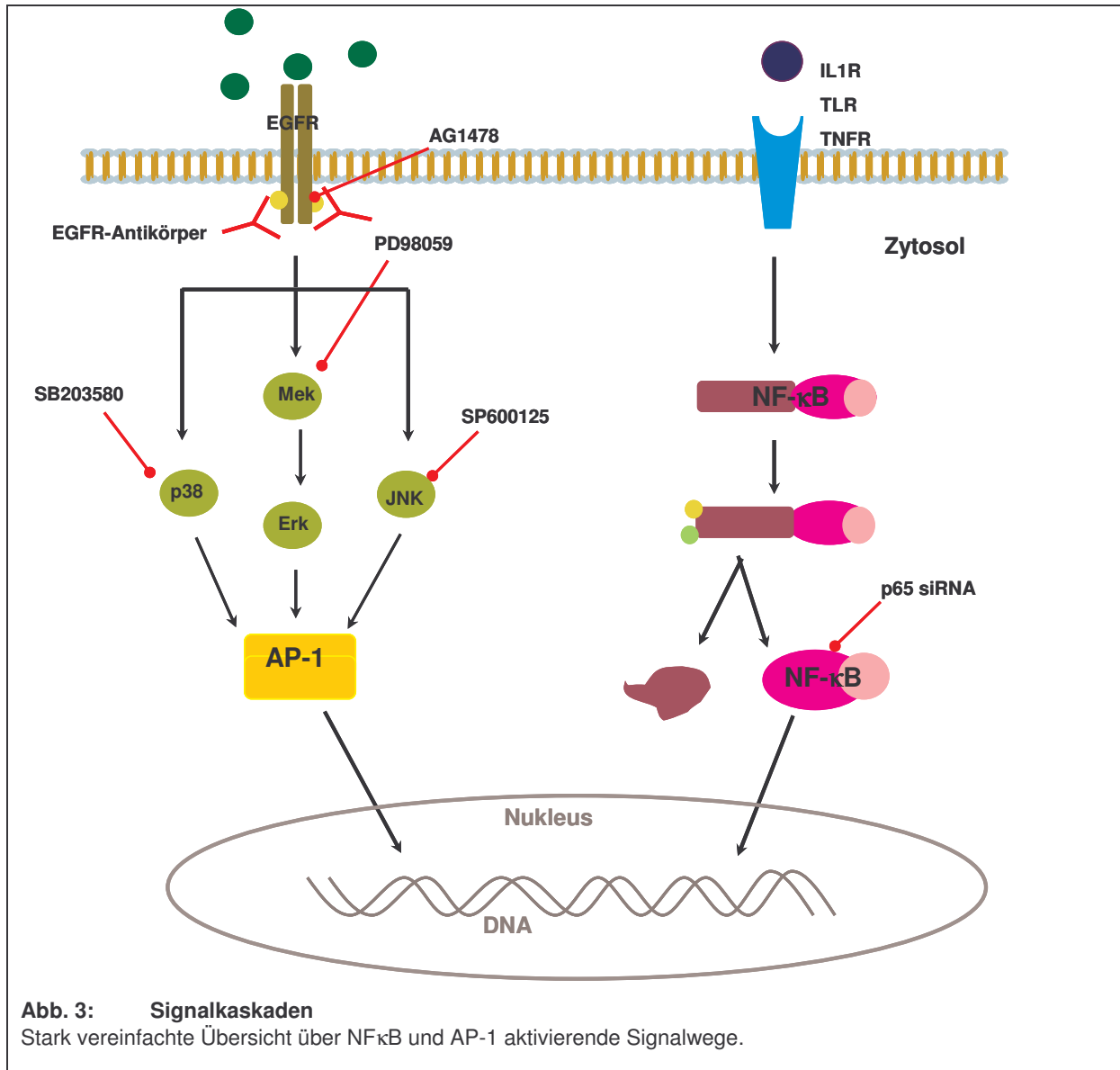
Der Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert eine Vielzahl an Genen, die für das Zellwachstums, die Immunantwort und Apoptosevorgänge eine entscheidende Rolle spielen. In Säugetieren sind fünf Mitglieder der NF κ B/Rel Familie bekannt (p65 (Rel-A), p50 (NF κ B1/p105), p52 (NF κ B2/p100), Rel-B und c-Rel). Diese bilden Homo- und Heterodimere (Ghosh *et al.*, 1998), welche in unstimulierten Zellen — auf Grund von Interaktionen mit Inhibitor-Proteinen (I κ B) — im Zytoplasma vorliegen. NF κ B wird ubiquitär exprimiert. Die am häufigsten vorkommende Form ist ein Dimer aus p65 und p50 Untereinheiten, das durch I κ B- α im Zytoplasma verankert ist. Aktiviert wird NF κ B durch mikrobielle und virale Infektionen oder durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α oder IL-1. Die Aktivierung von upstream Signalwegen führt zur Aktivierung des IKK Komplexes, der die Phosphorylierung und Degradierung von I κ B- α durch das 26S Proteasom bewirkt, was letztendlich in der transienten, nukleären Translokation von NF κ B resultiert. Im Zellkern bindet NF κ B an κ B-Sequenzen innerhalb der Promotorregion, wodurch die Gentranskription zahlreicher Gene aktiviert wird, wie z.B. von Interleukinen (IL-6, IL-8) oder seinem eigenen Inhibitor I κ B- α (Karin & Greten, 2005).

1.6.7 Activator Protein-1 (AP-1)

Activator Protein-1 (AP-1) ist ein dimerer Transkriptionsfaktorkomplex, der Mitglieder der Jun, Fos, ATF und Maf Proteinfamilien umfasst (Hess J *et al.*, 2006). Die Proteine binden als Homo- oder Heterodimere an „TPA-responsive elements“ oder „cAMP responsive elements“. Jedes dieser Proteine wird unterschiedlich exprimiert und reguliert, wodurch jede Zelle eine unterschiedliche Zusammensetzung an AP-1 Dimeren hat, die alle verschiedenartige Reaktionen bewirken. Allen gemeinsam ist eine konservierte Leuzin-Zipper Domäne, die für die Dimerisierung verantwortlich ist, und eine basische DNA-Bindedomäne.

AP-1 wirkt downstream von konservierten Signalkaskaden, wie MAPK, TGF β oder Wnt und ist einer der Schlüsselfaktoren der externe Stimuli in Veränderungen der Genexpression umwandelt. AP-1 wird von Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen bakterieller Infektionen aktiviert (Abb. 3). Diese Stimuli aktivieren MAPK-Kaskaden, welche die AP-1 Aktivität beispielsweise durch die Phosphorylierung bestimmter Substrate induzieren. Unterschiedliche AP-1 Dimere kontrollieren die Aktivierung oder Suppression der Transkription einer Vielzahl von Genen, die bei der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Transformation eine wichtige Rolle spielen. Die Regulation von AP-1 kann über die

Zusammensetzung der Dimere, die Transkription, post-translationale Modifikationen oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen erfolgen. MAP Kinasen regulieren die Fos/AP-1 Aktivität über Erk und die Jun/AP-1 Aktivität über JNK (Zenz & Wagner, 2006).

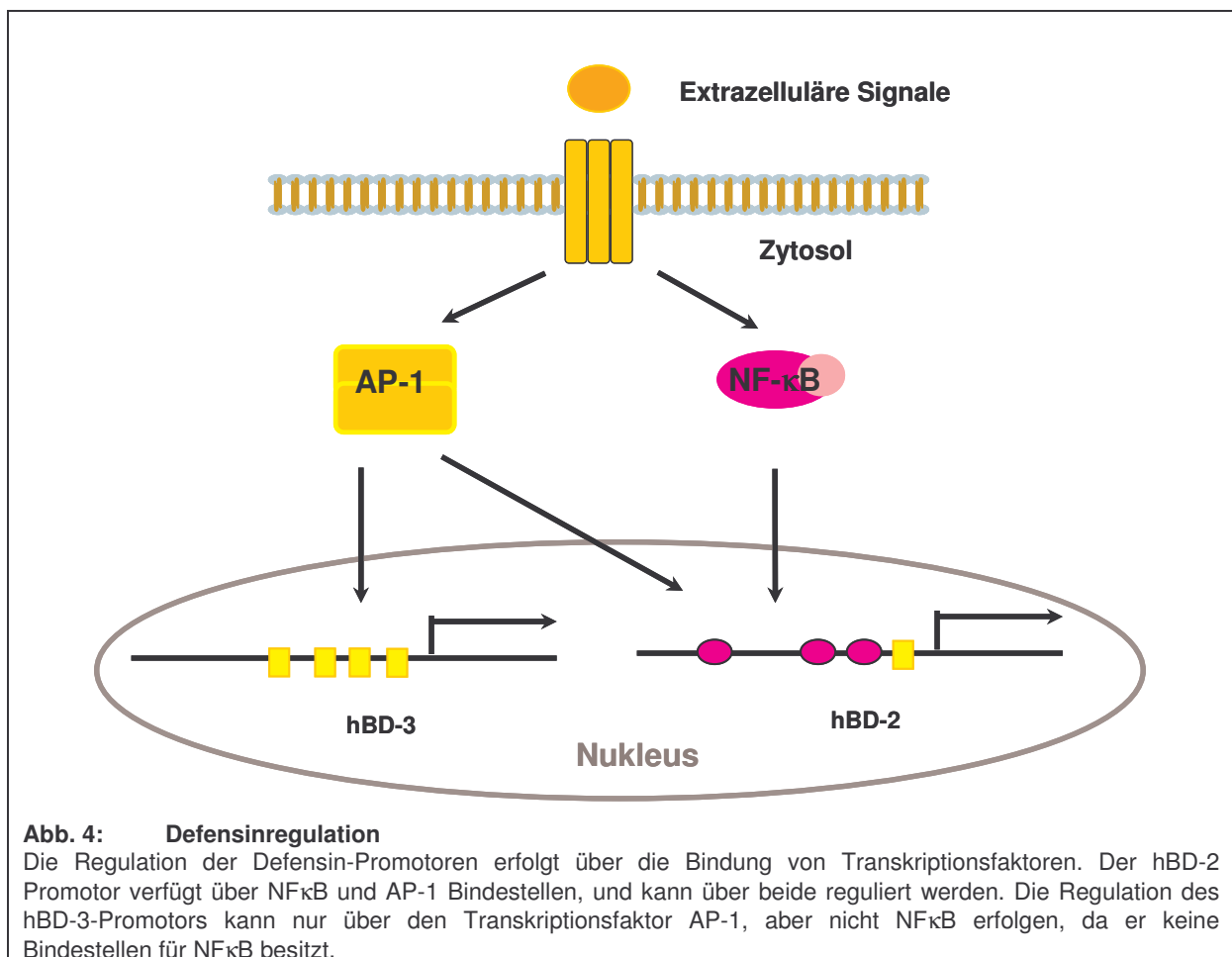


1.7 Regulation der Defensinexpression

Auch antimikrobielle Peptide scheinen bei der Erkennung und Abwehr von *Candida albicans* in Epithelien eine wichtige Rolle zu spielen. Zum einen konnten Analysen zeigen, dass eine *Candida albicans*-Besiedlung der oralen Mukosa die Bildung von hBD-2 und hBD-3 induziert (Feng *et al.*, 2005). Zum anderen ergaben Untersuchungen der Speichelflussrate und der Zusammensetzung des Speichels von gesunden Individuen und von Patienten mit Soorösophagitis, dass die Speichelflussrate und die Konzentration an antimikrobiellen

Peptiden, wie lösliches Immunglobulin A (sIgA), Lactoferrin, hBD-1 und hBD-2, bei Patienten mit oraler Candidiasis signifikant niedriger ist als bei gleichaltrig gesunden Individuen. Zusätzlich nimmt die Speichelflussrate und die Konzentration an antimikrobiellen Peptiden mit steigendem Alter deutlich ab (Tanida *et al.*, 2003).

Die Regulation der Defensine kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. HBD-1 wird vermutlich gar nicht reguliert und ist demnach konstant exprimiert. In der Promotorregion des hBD-2 Gens finden sich verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindestellen, unter anderem drei NFκB- und eine AP-1-Bindestelle (Harder *et al.*, 2000), die die Expression des Gens regulieren können (Abb. 4). Abhängig vom Stimulus und dem Ursprung der Epithelien wird hBD-2 beispielsweise durch den Transkriptionsfaktor NFκB alleine (Wang *et al.*, 2003), NFκB und AP-1 gemeinsam (Wehkamp *et al.*, 2004), oder AP-1 alleine (Moon *et al.*, 2006) reguliert. Dagegen konnten Analysen der hBD-3-Promotorregion bisher keine NFκB-Bindestelle nachweisen (Jia *et al.*, 2001), wodurch eine Regulation über NFκB nicht möglich ist. Dagegen konnten in der Promotorregion von hBD-3 AP-1 Bindestellen nachgewiesen werden, die die Regulation des Promotors ermöglichen (Sayama *et al.*, 2005, Garcia *et al.*, 2001b; Abb. 4).



1.8 Ziele der Arbeit

C. albicans-Befall der Speiseröhre wird auch als Candida-Ösophagitis oder Soorösophagitis bezeichnet. Wie oben bereits beschrieben, handelt es sich dabei um eine häufige Erkrankung des Ösophagus immunsupprimierter Patienten. Bei diesen Patienten ist das normalerweise herrschende Gleichgewicht zwischen natürlicher Bakterienflora und den Verteidigungsmechanismen des Ösophagusepithels gestört, so dass eine Besiedlung des Epithels für die Mikroorganismen möglich wird. Aber auch alte Menschen leiden häufig unter einer Soorösophagitis. Ursache dafür könnten molekulare Defekte oder Störung des Immunsystems sein, wie z.B. der Rückgang antimikrobieller Peptide im Speichel (Tanida *et al.*, 2003) oder fehlende Zytokinproduktion.

Um zu untersuchen, ob und in wie weit die bisher bekannten Defensine im Ösophagusepithel allgemein, und speziell während einer Candida-Ösophagitis exprimiert werden, wurden Biopsien von gesunden Individuen und von Patienten mit Soorösophagitis, in Vorversuchen zu dieser Arbeit, auf ihre Defensin-Expressionsmuster untersucht (Abb. 5). Dabei zeigte sich eine signifikante Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im gesunden Epithel und eine deutlich gesteigerte Expression von hBD-2 und hBD-3 in *Candida albicans*-befallenem Epithel. Das Expressionsniveau von hBD-1 blieb auch nach *Candida albicans*-Infektion konstant. Die anderen Defensine waren im Ösophagus so gut wie nicht nachweisbar und ihre Expression wurde durch eine *C. albicans*-Infektion auch nicht signifikant induziert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Regulation der Defensine hBD-2 und hBD-3 während einer *C. albicans*-Infektion des Ösophagus näher zu charakterisieren. Dabei sollte untersucht werden, ob die Expression der β -Defensine durch die *C. albicans*-Zellen direkt reguliert wird, oder durch indirekte Mechanismen wie z.B. sezernierte Zytokine. Weiterhin sollte geklärt werden, welche Transkriptionsfaktoren an der Regulation beteiligt sind und welche Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden. Um dies zu untersuchen, sollte ein *in vitro* Modell für die Candida-Ösophagitis etabliert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

[γ^{32} P]ATP	Amersham, Braunschweig
100bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Aceton reinst	Merck, Darmstadt
Acrylamid-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Agar Agar reinst	Merck, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Braunschweig
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
APS (Ammoniumperoxisulfat)	Merck, Darmstadt
aqua dest.	DeltaSelect, Dreieich
Aquatex	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA (Rinderalbumin)	Sigma, Deisenhofen
Carbenicillin (Sodium Salt)	Roth, Karlsruhe
Coomassie- Brilliant- Blue R-250	Serva, Heidelberg
DAB Substratlösung	DAKO Diagnostica, Hamburg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Applied Biosystems
DTT (Dithiotreithol)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
EMSA-Material	Promega, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FCS (Foetales Rinder Serum)	Biochrom KG, Berlin
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt

Material

HEPES	Merck, Darmstadt
LB Broth Base	Gibco
L-Glutamin (L-Glu)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Low Meling Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Lymphozytenseparationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	JT Baker, Deventer
Normalserum	DAKO Diagnostica, Hamburg
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640-Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, Deisenhofen
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
StrepABComplex	DAKO Diagnostica, Hamburg
TEMED (N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin)	Sigma, Deisenhofen
TissueTek Einfriermedium	Jung, Nussloch
Tris-Base (Trihydroxymethyldiamin)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Proteinassay- Bradford	BioRad, München

2.2 Biochemikalien

2.2.1 Antikörper

Anti-hBD-2	SantaCruz, USA
Anti-EGFR	SantaCruz, USA
Ziege Anti-Maus sekundär Antikörper	SantaCruz, USA
Affe Anti-Ziege sekundär Antikörper	SantaCruz, USA
NFκB- Untereinheiten	SantaCruz, USA
AP1-Untereinheit (c-jun)	SantaCruz, USA
EGFR-Neutralisierender Antikörper	Upstate, Biomol

2.2.2 Inhibitoren

Inhibitoren	Hersteller	Ziel	Endkonzentration
AG1478	Tocris, Ellisville, USA	EGF-Rezeptor	500 nM
Sulfasalazin	Calbiochem, Bad Soden	NFκB	300 μM
PD98059	Calbiochem, Bad Soden	Mek	10 μM
SB203580	Tocris, Ellisville, USA	p38	10 μM
SP600125	Tocris, Ellisville, USA	JNK	20 μM

Die Inhibitoren wurden in 100 % DMSO resuspendiert.

2.2.3 Enzyme

Ampli-Taq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems
RNase-Free DNase Set	Qiagen
SuperScript™II RNaseH	Invitrogen
T4-DNA Ligase	Promega
T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/μl)	Promega
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen

2.2.4 Oligonukleotide

Primer für die real time RT-PCR

Primer Genbanknr.		Sequenz	Produkt- länge [bp]	MP LC [°C]	AT [°C]
hBD-1 NM 005218	fo rev	5'-TTG TCT GAG ATG GCC TCA GGT GGT ACC-3' 5'-ATA CTT CAA AAG CAA TTT TCC TTT AT-3'	253	83	58
hBD-2 AF 448141	fo rev	5'-ATC AGC CAT GAG GGT CTT GT-3' 5'-GAG ACC ACA GGT GCC AAT TT-3'	173	80	58
hBD-3 NM 018661	fo rev	5'-AGC CTA GCA GCT ATG AGG ATC-3' 5'-CTT CGG CAG CAT TTT CGG CCA-3'	206	86	60
HD5 NM 021010	fo rev	5'-GCC ATC CCT GCT GCC ATT C-3' 5'-AGA TTT CAC ACC CCG GAG A-3'	241	86	60
HD6 NM 01926	fo rev	5'-CCT CAC CAT CCT CAC TGC TGT TC-3' 5'-CCA TGA CAG TGC AGG TCC CAT A-3'	266	85	60
EGFR NM 005228	fo rev	5'-TCG CAA AGG GCA TGA ACT ACT T-3' 5'-TTG ACA TGC TGC GGT GTT TT-3'	94	84	58
KGFR NM 022969.1	fo rev	5'-CTG GAT GTT GTG GAG CGA T-3' 5'-TGT AAT CTC CTT TTC TCT T-3'	377	85	57
PDGFR NM 006206	fo rev	5'-GAA GCT GTC AAC CTG CAT GA-3' 5'-CTT CCT TAG CAC GGA TCA GC-3'	187	79	58
IL-1β NM 000576	fo rev	5'-CCA GCT ACG AAT CTC CGA CCA CCA CTA A-3' 5'-TGC TTG AGA GGT GCT GAT GTA CCA GTT G-3'	586	86	60

Alle Primer für die real time RT-PCR wurden von Sigma ARK-Genosys, Deisenhofen hergestellt.

Oligonukleotide für den Electrophoretic Mobility Shift Assay

AP-1-Konsensussequenz	Stratagene, Heidelberg
NF κ B-Konsensussequenz	Stratagene, Heidelberg

Andere Primer

pUC/ M13 Primer fo	Promega
pUC/ M13 Primer rev	Promega
Oligo(dT) ¹⁵ Primer	Promega

2.2.5 Kits

Human Cytokine Array, Panel A	ARY0005	R&D Systems
Light Cycler FastStart DNA Master SYBR GreenI		Roche
NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kit		Macherey-Nagel
pGem-T® Vector System II		Promega
QIAExII Gel Extraction Kit		Qiagen
RNeasy total RNA Kit		Qiagen
SuperScript™II RnaseH		Invitrogen
You-Prime First Strand Beads Kit		Pharmacia Biotech
Zero Blunt Topo Cloning Kit		Invitrogen

2.2.6 Zytokine

Zytokine	Hersteller	Stock-Konzentration	Endkonzentration
TNFα	PreproTech	10 ng/ μ l	20 ng/ml
Human-TGFβ	PreproTech	1 ng/ μ l	50 ng/ml
IL-1β	Bachem	10 ng/ μ l	100 ng/ml
IL-8	Bachem	10 ng/ μ l	100 ng/ml
IL-10	Bachem	10 ng/ μ l	100 ng/ml
IFNγ	Bachem	10 ng/ μ l	100 ng/ml
Rantes	Bachem	10 ng/ μ l	100 ng/ml

Die Zytokine wurden in PBS/0,1 % BSA resuspendiert, soweit unter Punkt 2.6.3 nichts anderes angegeben ist.

2.2.7 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren	Hersteller	Stock-Konzentration	Endkonzentration
Human-EGF	PreproTech	10 ng/ μ l	100 ng/ml
Human-TGF α	PreproTech	5 ng/ μ l	50 ng/ml

Die Wachstumsfaktoren wurden in PBS/0,1 % BSA resuspendiert, soweit unter Punkt 2.6.3 nichts anderes angegeben ist.

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Mikroorganismen und Plasmide

Candida albicans klinisches Isolat

2.3.2 Zelllinien

OE21	oesophageal squamous carcinoma cell line, caucasian
KYSE70	oesophageal squamous carcinoma cell line, japanese
KYSE7150	
KYSE7180	
KYSE410	
Colo680N	oesophageal squamous carcinoma cell line, black

2.4 Verbrauchsmaterialien

15ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
50ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
6-well Platten	Falcon
Einmalpipetten	Sarstedt
Glaskapillaren	Roche
Handschuhe	Hartmann
Heparinisierte Röhrchen	Qiagen
Kryoröhrchen	Sarstedt
Kryo-Box	Nalgene
Leucosep-Röhrchen	Greiner
LightCycler® Kapillaren	Roche

Material

Mikrotiterplatten	Nunc
Nunc-Immuno Plate, C96 Maxisorp	Nunc
PCR-Tubes	Sarstedt
Pipettenspitzen	Eppendorf
Polaroidfilme	Kodak
Probengefäße (0,5 ml)	Eppendorf
Probengefäße (1,5 ml)	Sarstedt
QIAshredder (250)	Qiagen
Gewebeeinbett Röhrchen	Sarstedt
Sephadex G-50 Säulen, NICK Column	Pharmacia LKB
Superfrost Objektträger	Superfrost Plus, Menzel
Transwell Einsätze (0,4 µm)	Falcon
Whatmann 3MM, Filterpapier	Walter
Zellkulturflaschen T75	Sarstedt
Zellkulturschale 10 cm	Sarstedt
Zellspatel	Nunc

2.5 Geräte

37°C Schüttelwasserbad	GFL
Autoradiographiegerät	BioRad
Brutschrank, Sterikult 200	Labotect
Chemi-Doc	BioRad
Densitometer, Bio Doc II	Biometra
Eismaschine AF100	Scotsman
Elektrophoresenetzgerät , 3000 Xi	Bio-Rad
Fluoreszenz- Thermo- Cycler, LightCycler®	Roche
Gelkammer horizontal, Horizon	Invitrogen
Gelkammer vertikal	Biometra
Gießkammer horizontal	Invitrogen
Kühlschrank 4 °C	Liebherr
Kühlzentrifuge, Heraeus	Kendro
Laminar Flow Bench, Steril Gard Hood	Baker Comp Inc
Mikroskop Axiovert	Zeiss
Mikroskop Axioplan	Zeiss
Mikrotom	Microm

Material

Mikrowelle	Miele
Netzgerät Power Pack P25	Biometra
Thermocycler 2720	Applied Biosystems
pH-Meter	Eydam
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf
Pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten (10, 100, 1000µl), Eppendorf	Eppendorf
Plattenphotometer	Dynatec
Sofortbildkamera, Camag Reprostar II	Polaroid
SpeedVac- Vakuumtrockner	Savant
Stickstofftonne	AirLiquide
Thermocycler, Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
Thermomixer, 5436	Eppendorf
Tiefkühlschrank –20 °C	Liebherr
Tiefkühlschrank –80 °C	Hans S Schröder GmbH
Tischzentrifuge, 5415C	Eppendorf
Ultraturrax, T25	Janke und Kunkel
UV-Lampe, high performance Transiluminator	Ultraviolet products
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage	Mettler
Waage	Sartorius
Wärmebad, Typ 1002	GFL
Zentrifugen GPR Centrifuge	Beckmann
Zentrifugen, Biofuge fresco	Hereaus
Zentrifugen, Varifuge GL	Hereaus

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Medien

RPMI-Medium für die Zellkultur

RPMI 1640
10 % FCS
1 % Pen/Strep
1 % L-Glu
Lagerung bei 4 °C

Material

Einfriermedium 9 ml FCS
1 ml DMSO
immer frisch angesetzt und steril filtriert

LB-Medium 10 g LB Broth Base
autoklaviert
Lagerung bei 4 °C

LB-Agar 10 g LB Broth Base
7,5 g Agar Agar

autoklaviert, Zugabe des Antibiotikums nachdem der Agar handwarm war, gemischt, Platten gegossen

Lagerung bei 4 °C

2.6.2 Puffer

Blocking Buffer 2,5 g Magermilchpulver
50 ml 1x PBS
0,1 % Tween 20

Coomassie-Lösung 20 % Methanol
12,5 % Essigsäure
0,2 % Coomassie Brilliant-Blue R-250

Elektrophorese-Laufpuffer 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS
pH 8,3

EMSA I: 10 mM Hepes (pH 7,9)
10 mM KCl
0,2 mM EDTA
1 mM DTT
0,5 mM PMSF
Lagerung bei RT

Vor Verwendung Zugabe von 10 µg/ml Aprotinin

EMSA II:	20 mM Hepes (pH 7,9) 0,4 M NaCl 0,2 mM EDTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF Lagerung bei RT
Vor Verwendung Zugabe von	10 µg/ml Aprotinin
Entfärbelösung	20 % Methanol 12,5 % Essigsäure
Färbelösung (native PAA-Gele)	0,025 % Bromphenolblau 0,025 % Xylencyanal
Lämmli-Probenpuffer (2x)	128 mM Tris/HCl 4,6 % SDS 10 % Glycerin 0,005 % Bromphenolblau pH 6,8
50x TAE	242 g Tris-Base 57,1 ml konz. Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 l mit aqua dest. autoklaviert Lagerung bei RT
5X TBE	54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 l mit aqua dest. autoklaviert Lagerung bei RT
TBS-Puffer	50 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl

TE-Puffer 10 mM Tris/HCl pH 7,4
1 mM EDTA pH 8,0

Trenngel-Puffer (denat. PAA-Gel) 1,5 M Tris/HCl
0,4 % SDS
pH 8,8

Sammelgel-Puffer (denat. PAA-Gel) 0,5 M Tris/HCl
0,4 % SDS
pH 6,8

2.6.3 Reagenzienrekonstitution

Human-TGF β 1 μ g + 20 μ l 10 mM Zitronensäure pH 3,0
 \Rightarrow 50 μ g/ml Stock

1 : 50 Verdünnung des 50 μ g/ml Stocks in
PBS/2 mg/ml BSA

\Rightarrow **1 μ g/ml Arbeitslösung**

aliquotiert zu je 45 μ l
Lagerung bei -20°C

2.6.4 Gelrezepte

12,5 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel

Trenngel 12,5 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung
7,5 ml Trenngelpuffer
100 μ l APS (10 %)
15 μ l TEMED
ad 30 ml aqua dest.

Sammelgel

1,5 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung
2,5 ml Sammelgelpuffer
30 µl APS (10 %)
10 µl TEMED
ad 10 ml aqua dest.

8 %iges natives PAA-Gel

10 ml 40 %ige Acrylamid Lösung
35 ml aqua dest.
5 ml 5x TBE- Puffer
500 µl APS
50 µl TEMED

3 Methoden

3.1 Gewebeproben

3.1.1 Gewinnung von Gewebeproben

Von Patienten der Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel, wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung Biopsien aus dem Ösophagus entnommen. Die Patienten unterzogen sich einer Routine-Ösophagogastroskopie bei verschiedenen medizinischen Indikationen. Es wurde makroskopisch gesundes Gewebe gewählt, sowie befallenes Gewebe bei Patienten mit Soorösophagitis. Die Studie wurde der Ethikkommission der Universität Kiel gemeldet und von ihr bewilligt (Code AZ.: A158/01).

Insgesamt wurden 16 Patienten mit gesundem Ösophagus und 26 Patienten mit Erkrankungen des Ösophagus ösophagogastroskopiert. Die Patienten der Kontrollgruppe hatten alle einen endoskopischen Normalbefund. Bei einer Altersspanne von 20-80 Jahren lag das mittlere Alter bei 55 Jahren. 19 Patienten in einer Altersspanne von 35-92 Jahren (im Mittel 65 Jahre) waren an einer Soorösophagitis erkrankt.

	Ösophagus gesund	Soorösophagitis
Anzahl	16	19
Alter	20-80 (MW 55) Jahre	35-92 (MW 65) Jahre
Geschlecht	11w/5m	5w/14m

Nach Entnahme wurden zwei der Biopsien für die RNA-Isolierung (Siehe Abschnitt 3.3) sofort in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Für histologische Untersuchungen wurden jeweils zwei weitere Biopsien entnommen, in Tissue Tek® eingebettet, bei -196°C schockgefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *Candida albicans*

Die Bereitstellung und Kultivierung von *Candida albicans* wurde von Mitarbeitern des Instituts für Infektionsmedizin in Kiel übernommen. Die Herstellung der Suspensionskulturen und der Überstände sind im Folgenden zum besseren Verständnis kurz beschrieben.

Stimulationsexperimente und die Herstellung von *Candida albicans*-Kulturüberständen wurden in den Laboren des oben genannten Instituts durchgeführt.

3.2.1.1 Herstellung von *Candida albicans*-Suspensionskulturen

Für die Herstellung von *Candida albicans*-Suspensionskulturen wurden die Hefen mit Hilfe einer Impföse aus einer Glycerinkultur (-80 °C) des entsprechenden Stammes entnommen und in BHI-(Brain-heart-infusion) Medium angeimpft. Nach einer 16-stündigen Inkubation wurde mit der Hefekultur RPMI-Medium angeimpft und weitere 3h kultiviert. Dieses Medium besaß eine Konzentration von ca. 10^7 *Candida albicans*-Zellen/ml und wurde für die Herstellung von RPMI-Medium mit einer *C. albicans*-Konzentration von 10^4 Zellen/ml verwendet, welches für Stimulationsexperimente eingesetzt wurde (3.2.3.3).

3.2.1.2 Herstellung von *Candida albicans*-Überständen

Für die Herstellung von *Candida albicans*-Überständen wurde zunächst wie unter Punkt 3.2.1.1 beschrieben vorgegangen. Im Anschluss wurde die Suspensionskultur für weitere 48 h kultiviert, wodurch sich die Konzentration der *C. albicans*-Zellen auf ein konstantes Niveau von 10^6 bis 10^7 Zellen/ml erhöhte. Anschließend wurde die Kultur 5 min zentrifugiert und der Überstand über einen Filter sterilfiltriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Isolierung humaner polymorphonukleärer Zellen (PMZ) aus peripherem Blut

Für die Isolation polymorphonukleärer Zellen (PMZ) aus peripherem Blut durch Dichtegradienten-Zentrifugation, wurde freiwilligen Blutspendern jeweils 20 ml peripheres Blut in heparinisierte Röhrchen entnommen.

Leucosep®-Röhrchen wurden mit 15 ml Lymphozytenseparationsmedium befüllt und für 30 sec bei 1000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Lymphozytenseparationsmedium zunächst mit 10 ml PBS (Raumtemperatur) und danach mit 20 ml peripherem Blut vorsichtig überschichtet. Die gefüllten Leucosep®-Röhrchen wurden ohne Bremse für 20 min bei 1700 rpm zentrifugiert. Das überständige Plasma wurde bis zur Leukozytenfraktion abgesaugt, die weißen Blutzellen mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die PMZ wurden zum Waschen mit 15 ml PBS resuspendiert und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen ein weiteres Mal gewaschen. Im Anschluss wurden die isolierten Zellen in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen, in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und ihre Zellzahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt.

3.2.3 Kultivierung humaner eukaryotischer Zelllinien

OE21-Zellen sind adhärent wachsende ösophageale Plattenepithel-Karzinomzellen. Sie wurden in RPMI-Medium kultiviert, welches zusätzlich mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep und 2 mM L-Glu versetzt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter Wasserdampf-gesättigter 5 %iger CO₂-Athmosphäre in 75cm²-Kulturgefäßen.

3.2.3.1 Einfrieren und auftauen

Zur Kryo-Konservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen von den Zellkulturflaschen abgelöst und abzentrifugiert (siehe Punkt 3.2.3.2). Anschließend wurden die Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryo-Gefäße überführt. Diese wurden in Kryo-Boxen (Nalgene) zunächst für 24 h bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen von Zellen, wurden die Kryo-Gefäße leicht aufgedreht und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und 10 ml RPMI-Medium tropfenweise zugegeben. Nach 10 min Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in frischem RPMI-Medium resuspendiert und in 1-2 75cm²-Kulturgefäßen ausgesetzt.

3.2.3.2 Subkultivierung der OE21-Zellen

Die OE21-Zellen wurden zwei Mal in der Woche bei einer Konfluenz von ca. 90 % subkultiviert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 15 ml PBS gewaschen und anschließend 10 min mit 5 ml Trypsin-EDTA bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Klopfen an der Kulturflasche vom Kulturflaschenboden vollständig abgelöst. Durch Zugabe des doppelten Volumens an Zellkulturmedium wurde die Trypsin-bedingte enzymatische Proteolyse abgestoppt. Nach der Zentrifugation (10 min 1000 rpm) wurde das Trypsin-haltige Medium abgesaugt, die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in 75 cm²-Kulturgefäßen oder 6-well Platten (2 x 10⁵ Zellen/well) ausgesät.

3.2.3.3 Stimulation der Zellen

Für Stimulationsexperimente wurden die OE21-Zellen in 6-well Platten ausgesetzt (siehe oben) und für 48 h bei 37°C inkubiert. Der Stimulus wurde in der angegebenen Konzentration in RPMI-Medium aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Die Stimulationszeit betrug 1-24 h, unmittelbar danach wurden die Zellen entsprechend der geplanten Experimente weiter verarbeitet. Als Stimuli wurden *Candida albicans* (siehe 3.2.1), PMZ (siehe 3.2.2), Zytokine (siehe 2.2.6) und Wachstumsfaktoren (siehe 2.2.7) eingesetzt. Die Zytokine und Wachstumsfaktoren wurden, soweit vom Hersteller nicht anders angegeben, in PBS + 0,1 % BSA (w/v) gelöst. BSA sollte dabei eine mögliche unspezifische Wechselwirkung des Stimulus mit der Gefäßwand verhindern.

Die Stimulation mit *Candida albicans*-Suspensionskulturen erfolgte entweder „direkt“ oder „indirekt“. Bei der „direkten“ Stimulation wurde 1,5 ml Zellkulturmedium pro well vorgelegt und zusätzlich 1,5 ml *Candida albicans*-Suspensionskultur pro well zugegeben. *Candida albicans*-Zellen und OE21-Zellen wuchsen mit direktem Zell-Zellkontakt (Abb. 12 A).

Bei der „indirekten“ Stimulationsmethode wurde ebenfalls 1,5 ml Zellkulturmedium vorgelegt. Anschließend wurde ein Transwell-Einsatz (Porengröße 0,4 µm) in jedes well gesetzt. In jeden Transwell-Einsatz wurde 1,5 ml *Candida albicans*-Suspensionskultur gegeben (Abb. 12 B). Auf diese Weise wurde der direkten Zellkontakt zwischen *Candida albicans*- und OE21-Zellen verhindert, Stoffaustausch löslicher Substanzen <0,4 µM war jedoch möglich. Mit Hilfe eines Invert-Mikroskops (Axiovert) wurde kontrolliert, dass keine *Candida albicans*-Zellen in dem unteren Teil der 6-well Platte wuchsen.

Analog wurde die „direkte“ und „indirekte“ Stimulation der OE21-Zellen mit PMZ durchgeführt. Bei Kostimulation mit *Candida albicans*- und PMZ wurde kein Zellkulturmedium zusätzlich dazugegeben.

Die Ausgangskonzentration der *Candida albicans*-Kultur betrug 1×10^4 Zellen/ml, die Konzentration der PMZ 1×10^6 Zellen/ml. Durch die beschriebene Stimulation ergab sich eine Endkonzentration an *Candida albicans*- bzw. PMZ von 5×10^3 bzw. 5×10^5 Zellen/ml.

3.2.3.4 Gewinnung von Überständen

Zur Analyse der von den OE21-Zellen nach Stimulation freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren wurden die Überstände der Stimulationsexperimente nach Inkubationsende in 1,5 ml Probengefäße überführt, abzentrifugiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4 siRNA-Transfektion von eukaryotischen Zellen

Als Transfektion wird die Einschleusung von DNA in Säugetierzellen verstanden.

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 OE21-Zellen durchgeführt, die selektiv die Expression von RelA/p65 inhibieren sollte, um zu überprüfen, ob die Aktivierung von NF κ B durch *Candida albicans*-Infektion zu einer Induktion von hBD-2 und hBD-3 führt. Es wurde eine doppelsträngige „Stealth“-siRNA für RelA/p65 von der Firma Invitrogen verwendet. Als Kontrolle diente eine unspezifische dsRNA von Invitrogen. OE21-Zellen wurden in 6-well Platten mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/well ausgesetzt und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit RNAiFect Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. 2 μg /well siRNA (20 μM) und 12 μl RNAiFect 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 48 h auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mit 48 stündigen *Candida albicans*-Überständen für 24 h inkubiert und die Zellen für eine RNA-Isolierung (3.3) mit anschließender mRNA-Expressions-Analyse (3.7) oder Gel-shift-Experimente (3.12) benutzt.

3.3 RNA-Isolation

Die Materialien und Lösungen für das Arbeiten mit RNA wurden mittels DEPC von RNasen befreit. Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.3.1 Aufarbeitung der Gewebeproben

Die bei -80°C gelagerten Biopsien wurden zunächst mechanisch mit einem Ultraturaxrotor (2000 rpm) in 500 μl RNase-freiem Lysispuffer, unter Zusatz von 5 %igem β -Mercaptoethanol, 1 min homogenisiert. Die Homogenisate wurden über QIA-Shredder (Qiagen) gegeben, um genomisches Material von zellulären Bestandteilen zu trennen. Der Lysispuffer enthält Guanidin-Isothiocyanat, welches eventuell vorhandene RNasen inaktiviert und so die Isolation von intakter RNA sicher stellt.

3.3.2 Aufbereitung der Zellen

OE21-Zellen aus Stimulationsexperimenten (Siehe Punkt 3.2.3.3) wurden nach Stimulationsende ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 μl RNase-freiem Lysispuffer (3 % β -Mercaptoethanol)/well lysiert. Die Zellysate wurden ebenfalls über QIA-Shredder (Qiagen) gegeben.

3.3.3 Protokoll der RNA-Isolation

Nach der Abtrennung des genomischen Materials wurde 1 Volumenanteil 70%igen Ethanol zu dem Filtrat gegeben und die Proben 1 min homogenisiert. Auf diese Weise wurden die Nukleinsäuren gefällt und hochmolekulare DNA zerstört. So entstehen geeignete Bedingungen für die Bindung von RNA an den Silika-Gel basierenden Membranen der RNeasy Mini Säulen. Nachdem die Lysate über die RNeasy Mini Säulen gegeben wurden und die RNA an der Membran gebunden vorlag, konnten Protein-Verunreinigungen mit Hilfe wiederholter RW-1-Puffer Waschschrte entfernt werden. Ein zusätzlicher DNA-Verdau mit RNase-freier Desoxyribonuklease I garantierte vollständige Entfernung von DNA aus den Proben. Die RNA wurde in 50 μl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert, anschließend bei 68°C für 7 min denaturiert, die RNA-Konzentration (3.4.1) durch Messung der Nukleinsäure-Extinktion bei 260nm mit einem Biophotometer (Eppendorf) photometrisch bestimmt und in cDNA mit dem Superscript- Kit (Invitrogen) (3.5) transkribiert.

3.4 Konzentrationsbestimmung

3.4.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der isolierten gesamt RNA erfolgte spektralphotometrisch durch Bestimmung der Absorption mit einem Bio-Photometer (Eppendorf). Nukleinsäuren zeigen bei 260 nm ein spezifisches Absorptionsmaximum, wobei eine Absorption von 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 41,2 µg/ml entspricht (Sambrook *et al.*, 1989).

Zur Messung wurden 5 µl Nukleinsäurelösung im Verhältnis 1:20 mit aqua dest. verdünnt und die RNA-Konzentration bestimmt:

$$\text{Konzentration RNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 41,2 \mu\text{g/ml} \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Um die Probenkontamination beurteilen zu können, wurde auch das Absorptionsmaximum der Proteine bei 280 nm ermittelt. Das Extinktionsverhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ sollte für nachfolgende Versuchsreihen zwischen 1,6 und 2,0 liegen, da dies für eine geringe Proteinkontamination spricht und erhöhter Proteingehalt die optimale Transkription der mRNA in cDNA behindert.

3.4.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung von dsDNA erfolgte ebenfalls spektralphotometrisch. Dabei entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml. Nach Absorptionmessung kann die DNA-Konzentration einer Lösung mit der Formel:

$$\text{Konzentration dsDNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

berechnet werden.

3.4.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein modifizierter Proteinassay nach Bradford (1976) der Fa. BioRad durchgeführt. Hierbei wurden pro Ansatz 5 µl der Probe bzw. deren Verdünnung auf Mikrotiterplatten vorgelegt und mit 250 µl der Reagenzverdünnung (1:5) versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotiterplatte in einem Plattenphotometer (Dynatec) bei einer Wellenlänge von 630 nm gemessen. Die Proteinmenge wurde gegenüber einer Standardreihe (0,5 - 5 µg BSA) ermittelt.

3.5 Reverse Transkription (RT)

Die aus den Zellen oder Geweben isolierte RNA (3.3.3) wurde zur weiteren Analyse durch reverse Transkription (RT) in stabilere, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Bei diesem Prozess wird die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus genutzt (Gallo 1971).

Für Gewebeproben wurde das „You-Prime First Strand Beads“ Kit (Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben verwendet, wobei 2 µg RNA in 1h bei 37°C in cDNA umgeschrieben wurden. Zellkulturproben wurden mit SuperScript™ II (Invitrogen) Reverse Transkriptase umgeschrieben. In beiden Fällen wurden Oligo-dT-Primer verwendet, um sicherzustellen, dass nur mRNA revers transkribiert wird. Die Reaktionsgefäße der Zellkulturansätze enthielten 2 µg RNA, 1 µg Oligo-dT-Primer, 10 mM dNTPs und 200 U SuperScript™. Das Umschreiben in cDNA erfolgte hier bei 42°C für 1 h.

	“You-Prime First Strand Beads” Kit	SuperScript™II
	Gewebeproben	Zellkulturproben
RNA	2 µg	2 µg
Enzym	-	1 µl
dNTPs	-	1 µl
Oligo-dT-Primer	2 µl	2 µl
0,1 M DTT	-	2 µl
5x Puffer	-	4 µl
aqua dest.	ad 33 µl	ad 20 µl
Inkubation 1 h	37°C	42°C

Anschließend wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, so dass die cDNA Konzentration 20 ng/µl entsprach. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei –20°C gelagert.

3.6 Generierung externer Standards

Vorraussetzung für die absolute Quantifizierung der PCR Produkte über externe Standards ist, dass der Standard die Sequenz der gesuchten Ziel-DNA in exakt bekannter Konzentration enthält. Daher wurden zunächst die für die jeweiligen Zielproteine kodierenden Genabschnitte in einer Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis *et al.*, 1986) vervielfältigt. Die PCR ist eine Methode, um DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren und besteht aus den Phasen Denaturierung, Primer Anlagerung (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation). Die PCR wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Spezifität der Oligonukleotid-Primer in Bezug auf die vom Hersteller angegebenen Schmelzpunkte variiert. Die für die PCR verwendeten Primer sind unter Punkt 2.2.4 aufgeführt.

3.6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Für die Amplifizierung der Protein-spezifischen Zielsequenz wurden die Primer der real time RT-PCR (2.2.4) und cDNA eingesetzt. Dabei wurde cDNA verwendet, bei der in Vorversuchen eine hohe Konzentration des zu amplifizierenden Proteins nachgewiesen werden konnte. Die Reaktionen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 60 µl in einem Thermocycler (Perkin Elmer) durchgeführt. Zur Amplifikation wurde „Taq DNA Polymerase“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein 60 µl Standard-PCR-Ansatz enthielt:

80 ng cDNA	4 µl
10x PCR- Puffer	6 µl
1,5 mM MgCl₂	1,8 µl
10 mM dNTP	4,8 µl
5 U/µl Taq-Polymerase	0,6 µl
10 µM 5'- Primer	1,5 µl
10 µM 3'- Primer	1,5 µl
aqua dest.	39,8 µl

Die PCR wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	45 sec	
Annealing	C° siehe 2.2.4.	45 sec	
Amplifikation	72 °C	1 min	
Finale Amplifikation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

3.6.2 Aufreinigung der spezifischen PCR-Produkte

Zur Aufreinigung und Identifizierung des gesuchten PCR-Produktes wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden 55 µl der PCR-Produkte mit 6 µl Auftragspuffer auf einem 1,7 %igem low-melting Agarosegel (TAE-Puffer) aufgetragen. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 60 °C und Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid wurde die Lösung in eine horizontale Gießkammer gegossen. Die DNA wurde mit DNA-Auftragspuffer versetzt und zur Größenkontrolle ein Größenstandard parallel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung über 1 h bei 100 V in TAE-Puffer wurden die Produkt-spezifischen Banden durch Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei 266 nm detektiert und mit Hilfe einer Polaroidkamera unter UV-Licht dokumentiert.

Für die Aufreinigung aus der Agarose wurden die Produkt-spezifischen Banden ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAEX II Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (3.4.2).

3.6.3 Klonierung und Transformation

Die aufgereinigten PCR-Produkte der antimikrobiellen Peptide wurden in den pCR-Blunt II-Topo Vektor (3519bp) mit Hilfe des „Zero Blunt Topo Cloning Kit“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers ligiert. Die PCR-Produkte der Wachstumsfaktor-Rezeptoren wurden in den pGEM-T Vector (3000bp, Promega) mittels T4-DNA Ligase ligiert. Der Ligationsansatz bestand hier aus:

PCR-Produkt	1,5 µl
2x Rapid Ligation Buffer	2,5 µl
50 ng pGEM-T Vektor	0,5 µl
T4-DNA Ligase	0,5 µl

Die Ansätze wurden für 16 h bei 4°C inkubiert und anschließend in kompetente *Escherichia coli*-Zellen (Top10 *E.coli*) transfiziert. Dazu wurden 50 µl der *Escherichia coli*-Suspension mit 2 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert, für 45 sec bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 125 µl SOC-Medium zugegeben und der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit 100 µg/ml Carbenicillin versetzt waren und über Nacht bei 37°C inkubiert. Insert-tragende Klone wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (3.6.4) überprüft und das Plasmid mit Hilfe eines Mini-Präparationskit (Macherey-Nagel) (3.6.5) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.6.4 Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurden Vektor-spezifische Primer eingesetzt. Ohne Insert wird nur die Klonierungsstelle amplifiziert, während mit Insert ein entsprechend größeres PCR-Fragment amplifiziert wird. Die Größe der amplifizierten Fragmente wurde im Anschluss mit einem 8 %igen PAA-Gel überprüft.

3.6.4.1 Durchführung der Kolonie-PCR

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden direkt von der Agarplatte Zellen aus 5-10 Einzelkolonien entnommen und in 0,5 ml Probengefäße mit 30 µl PCR-Mix überführt. Gleichzeitig wurden mit den ausgewählten Klonen frische Carbenicillin-Agarplatten beimpft, die als Masterplatten für eine spätere Identifizierung Insert-tragender Klone dienen. Die Ansätze wurden zur Lyse der *E.coli*-Zellen und der Denaturierung der DNA für 5 min auf 95°C erhitzt. Für die Kolonie-PCR wurde der folgende Ansatz verwendet:

10x PCR- Puffer	3 µl
25 mM MgCl₂	2,4 µl
10 mM dNTP	0,6 µl
Ampli-Taq-Gold DNA Polymerase	0,15 µl
10 mM 5'- Primer	0,6 µl
10 mM 3'- Primer	0,6 µl
aqua dest.	21,65 µl

Die PCR wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Prä-Denaturierung	95 °C	9 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Annealing	58 °C	20 sec	
Amplifikation	72 °C	2 min	
Finale Amplifikation	72 °C	3 min	
Kühlung	4 °C	∞	

6 µl des PCR Ansatzes wurden mit 1 µl Probenauftragspuffer versetzt und in einem 8 % PAA-Gel über eine Stunde bei 100 V elektrophoretisch in TE-Puffer aufgetrennt. Die Masterplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Plasmid-tragende Kolonien wurden für eine Plasmidisolierung (3.6.5) in 10 ml LB-Medium angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation bei 3000 rpm geerntet (Varifuge GL, Hereaus).

3.6.5 Plasmidisolierung und Sequenzierung der Insert-tragenden Plasmide

Die Plasmidisolierung aus den geernteten Insert-positiven Klonen wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kit von Macherey und Nagel nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (ds DNA, 3.4.2). Die isolierten Plasmide wurden von den Sequence Laboratories Göttingen (www.seqlab.de) zur Kontrolle sequenziert.

3.6.6 Kalkulation der Plasmidkonzentration

Um die Anzahl der Plasmid-Moleküle zu ermitteln, wurde nach photometrischer Messung (Biophotometer Eppendorf) der DNA-Konzentration, mit folgender Formel die Kopienzahl der Plasmide je µl berechnet:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{X \text{ g}/\mu\text{l Plasmid-DNA}}{Y \times 660 \text{ g/mol}} \times 6,023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

- X = Photometrisch gemessene Plasmid-DNA-Konzentration in g/µl
- Y = Anzahl der Basenpaare des Plasmids plus der Länge des eingebauten DNA-Fragments (Insert) in Basenpaaren
- 660 g/mol = durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids
- $6,023 \times 10^{23}$ = Zahl von Avogadro (Anzahl der Kopien/mol)

3.6.7 Erstellung von Standardkurven

Nach der Kalkulation der Kopienzahl der einzelnen Plasmide, wurden von allen Plasmiden Verdünnungen auf eine Ausgangskonzentration von 10^8 Kopien/ μ l hergestellt. Diese Ausgangskonzentration wurde seriell um den Faktor 1:10 bis auf 1 Kopie/ μ l verdünnt. Jede Verdünnungsstufe wurde in drei Parallelansätzen im LightCycler® amplifiziert (3.7.2) und dabei die jeweils ersten Wendepunkte der berechneten Kurven (crossing points) für die jeweiligen Verdünnungen bestimmt. Standardmessungen wurden mehrfach an verschiedenen Tagen durchgeführt, um einen aussagekräftigen Mittelwert für jede Standardverdünnung berechnen zu können und Kalkulationstabellen im Excel-Format zu erstellen.

Anhand dieser Standardkurven konnte eine Quantifizierung der in der Probe enthaltenen RNA vorgenommen werden, da über den definierten Anstieg der Fluoreszenz und die Anzahl der durchgeführten Zyklen ein Rückschluss auf die Menge der vorliegenden Kopien des gesuchten Genproduktes pro μ l möglich war.

3.7 Real time RT-PCR

Zur Ermittlung der Genexpression der antimikrobiellen Peptide wurde die zuvor durch reverse Transkription hergestellte cDNA mittels real time RT-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. Im Unterschied zu der herkömmlichen PCR wird dem PCR Ansatz der real time RT-PCR ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR Green I, Roche, Mannheim) zugesetzt, der spezifisch für doppelsträngige DNA (ds DNA) ist. Während jedes Zyklus der PCR-Reaktion interkaliert der Farbstoff in den neu synthetisierten ds Produkten. Die Fluoreszenz der Reaktion steigt somit proportional zu der Konzentration an neu synthetisiertem Produkt an.

Dafür wurde eine PCR-Analyse mit zwei Gen-spezifischen Primern (2.2.4 und 3.7.2) durchgeführt. Zur Quantifizierung der Zielsequenz wurden externe Standardkurven (siehe 3.6.7.) für jedes Zielgen erstellt. Voraussetzung für die absolute Quantifizierung über externe Standards ist, dass der Standard die Sequenz der gesuchten Ziel-DNA in exakt bekannter Konzentration enthält. Die Standardkurve liefert Fluoreszenzintensitäten zu bekannten Produktkonzentrationen. Mit ihrer Hilfe ist somit eine quantitative Auswertung der Ergebnisse möglich.

3.7.1 Herstellung der Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (2.2.4) wurden auf der Grundlage bereits veröffentlichter Sequenzen Intron-überspannend ausgewählt. Hierzu wurde die Primer 3 Software von S.Rozen und HJ Skaletzky (2000) (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) verwendet.

3.7.2 PCR-Reaktion

Die real time RT-PCR Analysen wurden in einem Fluoreszenz-Temperatur-Cycler (LightCycler®, Roche) entsprechend den Herstellerinstruktionen durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde jedoch von 20µl auf 10µl reduziert. Dabei wurden 20 ng cDNA je Reaktionsansatz eingesetzt:

20 ng cDNA	1 µl
10x LightCycler®-Fast Start	
DNA Master SYBR GreenI	1 µl
25 mM MgCl₂	1,2 µl
10 µM 5'- Primer	0,5 µl
10 µM 3'- Primer	0,5 µl
aqua dest.	5,8 µl

Die PCR wurden als „touch down“-PCR über 5°C unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Prä-Denaturierung	95 °C	10 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 sec	
Annealing	siehe 2.2.4.	5 sec	
Amplifikation	72 °C	15 sec	
Fluoreszenzmessung	siehe 2.2.4.	nach jedem Zyklus	

Die Anlagerung der Primer (Annealing) erfolgte für jedes Primerpaar bei einer spezifischen, ihren jeweiligen Schmelzpunkten angepassten, Temperatur. Dabei wurde während der ersten 5 Zyklen eine touch-down PCR über 5°C durchgeführt. Die Annealing-Temperatur wurde

dafür in den ersten 5 Zyklen um jeweils ein Grad Celsius abgesenkt, um besonders stringente Bedingungen für die Primeranlagerung während der ersten Zyklen sicherzustellen. Im Anschluss 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, danach wurde die Temperatur langsam auf 95°C erhöht. Die Geschwindigkeit der Erwärmung betrug 0,1°C/sec, wobei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wurde. Mittels der Standardkurven im Excelformat (3.6) für die jeweiligen Gene war es möglich, die absolute mRNA-Expression mit Hilfe einer Excel-Tabellenkalkulation zu errechnen.

3.7.3 Statistische Analysen

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit abgebildeten Diagramme zu den Experimenten mit OE21-Zellen stellen, soweit nicht anders erwähnt, repräsentative Beispiele für mehrfach durchgeführte unabhängige Versuche dar, die vergleichbare Resultate aufwiesen. Versuche, die in Wiederholungen abweichende bzw. keine eindeutigen Resultate lieferten, fanden in dieser Arbeit keine Berücksichtigung.

Die Darstellung der ermittelten Ergebnisse erfolgte nach Berechnung der Mittelwerte aller Messergebnisse in einer Gruppe + Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Zur wissenschaftlichen Signifikanzprüfung wurde eine statistische Prüfung mittels einseitigem Student-Test (t-test) angewandt. Als signifikant gilt hierbei ein p-Wert von <0,05. Die Berechnung der Werte wurde mit der Software Excel (Microsoft) durchgeführt, ebenso die Erstellung der Diagramme.

3.8 Zytokin Array

Die Analyse der von den OE21-Zellen nach Stimulation freigesetzten Zytokinen erfolgte mit Hilfe des Human-Cytokine Array (R&D Systems) nach Angaben des Herstellers.

Dazu wurden die offenen Bindungsstellen der mit Primärantikörper beschichteten Cytokine Array Membranen für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. 1ml des Zellkulturüberstandes aus den Stimulationsexperimenten (3.2.3.3) wurde parallel für eine Stunde mit dem Detektions-Antikörper Cocktail inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem Zellkulturüberstand/Antikörper-Mix über Nacht bei 4°C unter Schütteln. Nach mehrmaligem Waschen, um nicht gebundenen Antikörper-Mix zu entfernen, wurden die Membranen 30 min mit Streptavidin-HRP inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten wurden die Signale mit ECL-Substrat angefärbt und im ChemiDoc (BioRad) für 60 sec detektiert.

Die Auswertung erfolgte über makroskopische Auswertung der Dot-Intensitäten und über analytische Auswertung der Pixelintensitäten mit der mitgelieferten Software (Quantity One).

3.9 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Tissue-Tek eingebettete und bei -80°C gelagerte Gewebeproben (3.1) verwendet. Mit einem Microtom (Microm) wurden $5\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, die auf Superfrost Objektträger (Menzel) aufgezogen und an der Luft getrocknet wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in Aceton bei $+4^{\circ}\text{C}$ fixiert. Zur Inhibierung der intrazellulär vorhandene Peroxidasen wurden die Gewebesektionen 10 min in einer 3 %igen methanolischen Wasserstoffperoxid-Lösung (45 ml Methanol + 5 ml 30%iges H_2O_2) inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Objektträger in TBS-Puffer wurde anschließend die überschüssige Wasserstoffperoxid-Lösung entfernt. Anschließend erfolgt eine 20 minütige Inkubation mit einem verdünnten Serum („Normalserum“ Dako, Verdünnungen 1:5 bis 1:20) von einer Tierspezies stammend, in der der sekundäre Antikörper hergestellt wurde. Danach wurden die Schnitte für 16 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ in einer feuchten Kammer mit dem jeweiligen Primärantikörper (2.2.1) (Verdünnung 1:50 oder 1:100) inkubiert. Nach Entfernung des primären Antikörpers durch mehrmaliges Spülen in TBS wurden die Schnitte mit den entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörpern (2.2.1) in einer 1:200 Verdünnung mit TBS-Puffer für 30 min inkubiert. Nach einer weiteren Reinigung in TBS wurde der StrepABComplex (2,5ml TBS + 22,5 μl Avidin + 22,5 μl Biotin) für 30 min auf die Präparate gegeben. Abschließend erfolgte nach TBS-Waschungen das Aufbringen der chromogenen Substratlösung DAB (Verdünnung: 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ TBS Puffer) für 2 bis 5 min unter lichtmikroskopischer Kontrolle, bis eine erkennbare Braunfärbung erreicht war. Die Farbreaktion wurde dann durch Waschen mit TBS-Puffer abgestoppt.

Nach Abschluss der immunhistochemischen Behandlung wurden die Präparate mit aqua dest. und Leitungswasser gespült und zur sichtbaren Darstellung des umliegenden Gewebes eine Gegenfärbung mit 10 %igem Hämatoxylin für ein bis zwei Minuten durchgeführt. Eine 10 minütige Spülung mit Leitungswasser diente der Blaufärbung der Zellkerne. Die Konservierung der Präparate erfolgte durch Eindecken in dem wässrigen Medium „Aquatex“. Die Photodokumentation positiver Immunreaktionen wurde am Lichtmikroskop mit einer Digitalkamera durchgeführt und mit der Software Photoshop 7.0 (Adobe) nachbearbeitet.

Die Lagerung von nicht angefärbten Kryoschnitten erfolgte bei -20°C .

3.10 Fluoreszenz-Färbungen

Für Fluoreszenz-Färbungen von Zellkulturen wurden OE21-Zellen in 6-well Platten mit Cover Slips ausgesät und für 24 h bei 37°C im Brutschrank wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Stimuli für weitere 60 min im Brutschrank inkubiert. Die Coverslips wurden aus den 6-well Platten mit einer Pinzette entnommen und 2 Mal mit 1x TBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min in Formalin bei Raumtemperatur auf den Cover Slips fixiert. Durch dreimaliges Waschen der Zellen in TBS-Puffer wurde die überschüssige Formalin-Lösung entfernt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation mit verdünntem Serum („Normalserum“ Dako, Verdünnungen 1:5 bis 1:20). Danach wurden die Schnitte für 16 h bei +4°C in einer feuchten Kammer mit p65-FITC Antikörper (Verdünnung 1:500) inkubiert. Der Antikörper wurde durch 3-maliges Spülen in TBS und 1-maligem Spülen mit aqua dest. entfernt. Die Konservierung der Präparate erfolgte durch Eindecken in dem wässrigen Medium „Aquatex“. Die Photodokumentation positiver Fluoreszenzsignale wurde am Fluoreszenzmikroskop mit einer Digitalkamera durchgeführt und mit der Software Photoshop 7.0 (Adobe) nachbearbeitet.

3.11 Western Blot

Eine gängige Methode zur Detektion der in verschiedenen Proben enthaltenen Menge eines bestimmten Proteins ist der Western Blot. Bei diesem werden identische Proteinkonzentrationen zunächst in einem Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen (geblottet) und anschließend mithilfe von spezifischen Antikörpern detektiert.

3.11.1 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der in den Proteinlösungen enthaltenen Proteine, wurden „10%ige NuPAGE BisTris“ Fertiggele von Invitrogen verwendet. Diese wurden in eine Novex-Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt und die Kammer mit 1x MES-Laufpuffer (Invitrogen) gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit den Proben befüllt. Diese waren zuvor auf eine Gesamtproteinkonzentration von 20 µg pro Probe eingestellt, mit aqua dest. auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt, zusätzlich mit 5 µl 4x Probenpuffer (Invitrogen) versetzt und 10 min bei 95 °C erhitzt worden. Als Größenstandard diente „SeeBlue Plus 2“ von Invitrogen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 30 min bei 200 V.

3.11.2 Blotten

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Ummantelung befreit und für 5-10 min in kaltem Transferpuffer äquilibriert. Für den Blotvorgang wurden „PVDF Membrane Filter Paper Sandwiches“ (Invitrogen) mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet. Die Membran wurde kurz in Methanol geschwenkt, 5 min in aqua dest. gewaschen und anschließend in Transferpuffer überführt. Whatman-Filterpapiere und Schwämme wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt und die Kammer wie folgt aufgebaut:

Kathode (-)
Schwämme
Whatman-Papier
Gel
PVDF-Membran
Whatman-Papier
Schwämme
Anode (+)

Die Kammer wurde in die Apparatur eingesetzt, diese mit Transferpuffer gefüllt und die Proteine bei 20 mA 60 min auf die Membran geblottet.

3.11.3 Entwicklung

Für die Entwicklung wurde die Membran zunächst für 5 - 10 min in PBST geschwenkt und anschließend für 1 h bei RT in 20 ml „Blocking Buffer“ auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde zwei Mal für 10 min in PBST gewaschen und dann mit dem Primärantikörper (1:500 Verdünnung in „Blocking Buffer“) über Nacht bei 4°C geschüttelt. Durch dreimaliges Waschen wurde nicht gebundener Primärantikörper von der Membran entfernt. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000 in „Blocking Buffer“) für 1 h auf die Membran gegeben und im Anschluss die Membran noch zwei Mal mit PBST gewaschen.

3.11.4 Detektion

Für die Visualisierung der Protein-Antikörper-Komplexe wurde „ECL Plus Western Blotting Detection Reagent“ von GE Healthcare benutzt, wobei die Abkürzung ECL für die Detektion durch Chemilumineszenz steht. Pro Membran wurden 500 µl Puffer A mit 10 µl Puffer B kurz vor Gebrauch gemischt, auf die Proteinseite der Membran gegeben und 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Entwicklung erfolgte im „Chemidoc“ mithilfe des „Quantity One 4.5.0“-Programms von BioRad.

3.12 Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

Die Methode des Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) dient der Untersuchung von Komplexen aus DNA und Transkriptionsfaktoren. 20-22 bp lange, radioaktiv markierte Oligonukleotide, die eine potentielle Bindungsstelle für den untersuchten Transkriptionsfaktor enthalten, werden mit Kernproteinextrakt inkubiert, in nativen PAA-Gelen aufgetrennt und der Autoradiographie unterzogen. Da Protein-DNA-Komplexe während der elektrophoretischen Auftrennung langsamer wandern, als ungebundene DNA, zeigen sich erstere auf dem Röntgenfilm als Banden oberhalb der Front ungebundener Oligonukleotide („Shift“). Die Zugabe von Antikörpern gegen den untersuchten Transkriptionsfaktor führt zur Bildung eines ternären Komplexes mit noch geringerer Mobilität und entsprechend weiter oben liegender Bande („Supershift“).

3.12.1 Isolierung von Kernproteinen

Nach Stimulationsende (3.2.3.3) wurden die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die Isolierung der Kernproteine war es wichtig, dass die Ansätze während der gesamten Isolationszeit auf Eis gehalten wurden.

In jedes well wurden 100 µl EMSA-Puffer I gegeben und die Zellen anschließend mit einem Zellspatel vollständig von dem Plattenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Röhrchen überführt, wobei jeweils die Zellen aus zwei wells (Doppelansätze) vereinigt wurden. Nach 20 sec Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen (zytoplasmatische Proteine) und das Kernpellet in 50 µl EMSA-Puffer II aufgenommen. Die Ansätze wurden zunächst für 20 min bei 4°C geschüttelt und anschließend 5 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der die Kernproteine enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Proteinkonzentration wurde ermittelt (2.2.7) und mittels denaturierender PAGE auf ihre Korrektheit überprüft.

3.12.1.1 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die qualitative und quantitative Überprüfung von Kernextrakten erfolgte mittels 12,5 %iger SDS-PAGE. Die Proben wurden mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt, bei 95°C 5 min denaturiert, 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, aufgetragen und bei 20 mA (Sammelgel) und 25 mA (Trenngel) elektrophoretisch aufgetrennt. Analytische Gele wurden nach der Elektrophorese 20 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Lösung fixiert und gefärbt und dann über Nacht in Entfärbelösung entfärbt. Danach wurden die Gele auf Whatmann-3MM-Papier übertragen und vakuumgetrocknet.

3.12.2 Radioaktive Markierung der Sonden

Bei den Sonden handelte es sich um doppelsträngige Oligonukleotide mit Konsensus-Sequenzen der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1. Die Oligonukleotide bestanden aus etwa 22-30 Nukleotiden. Diese Sonden wurden am 5' Ende mit [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP durch eine T4-Polynukleotid-Kinase radioaktiv markiert. Die Trennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente von nicht inkorporierten Nukleotiden erfolgte auf Sephadex G-50 Säulen. Das Eluat aus den Säulen wurde durch Vakuumzentrifugation im Speed Vac-Vacuumtrockner eingeeengt.

3.12.3 Gelshift

Für die Gelshift Analysen wurden die bei -80°C gelagerten Proben auf Eis aufgetaut. Pro Bindungsansatz wurde 5 µg Kernprotein eingesetzt, 0,25 ng radioaktiv markiertes Oligonukleotid (7000 cpm) und 2 µl Bindungspuffer (Promega).

Kernprotein	5 µg
radioaktiv markiertes Oligonukleotid (7000 cpm)	0,25 ng
Bindungspuffer	2 µl
aqua dest.	ad 10µl

Für Supershift Versuche wurde zusätzlich noch 2 µg Antikörper zu dem Ansatz dazugegeben.

Die Ansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert, damit die Kernproteine an den komplementären, radioaktiv markierten Oligonukleotide binden konnten. Im Anschluss wurden die Ansätze mit 1 µl Auftragspuffer versetzt und auf ein 8 %iges natives PAA-Gel aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele auf Whatman-3MM-Filterpapier gelegt, vakuumgetrocknet und der Autoradiographie unterzogen.

3.12.3.1 Native Protein-Gelelektrophorese

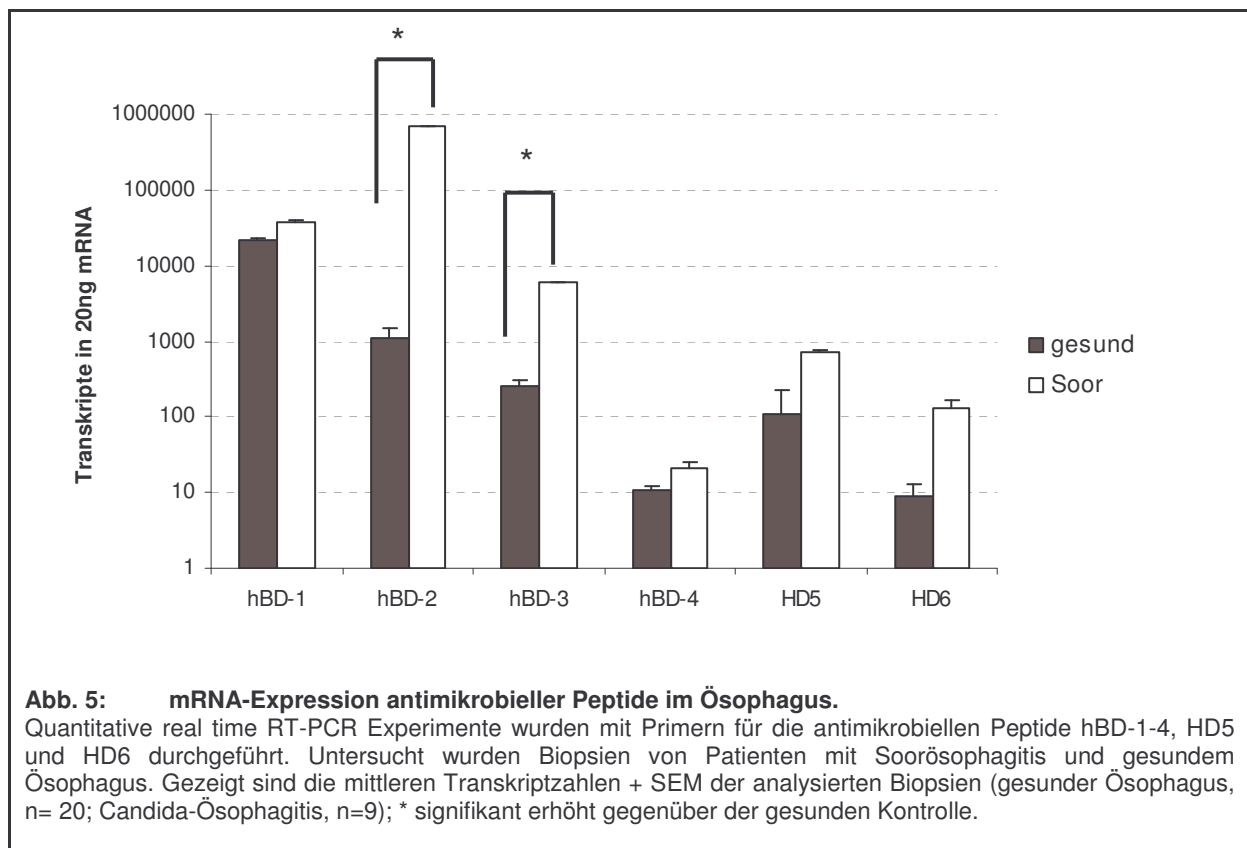
Für die EMSA wurden native 8 %ige PAA-Gele verwendet. Die Proben wurden mit 1 µl Färbelösung versetzt, aufgetragen und bei 250 V in 0,5 x TBE Puffer bei 4 °C für 1,5 h elektrophoretisch aufgetrennt.

4 Ergebnisse:

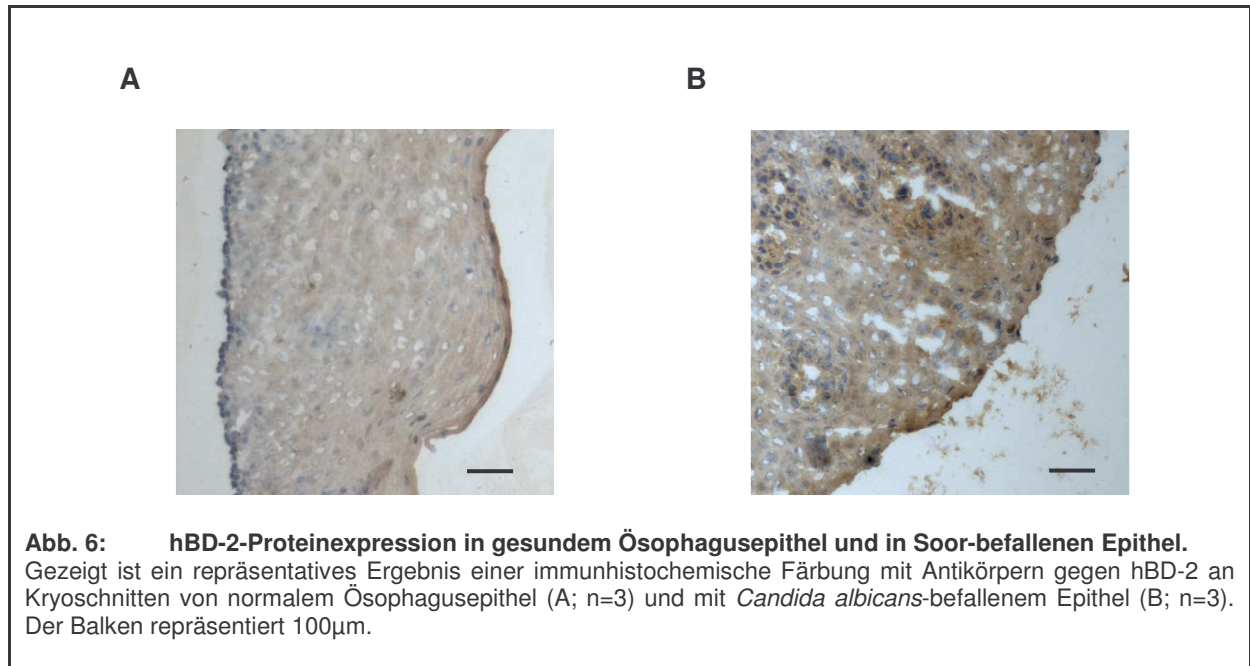
4.1 Expressionsuntersuchungen im Ösophagusepithel

4.1.1 Antimikrobielle Peptide

Während Entzündungen und Infektionen wird das Expressionsniveau von antimikrobiellen Peptiden in Geweben erhöht. Um zu untersuchen, ob diese Reaktion auch im Ösophagusepithel während einer Candida-Ösophagitis auftritt, wurde der mRNA-Expressionslevel der Defensine in Ösophagus-Biopsien von gesunden Individuen mittels real time RT-PCR untersucht und mit dem Level in Biopsien von Patienten mit Candida-Ösophagitis verglichen. Wie Abb. 5 zeigt, war die mRNA-Expression der antimikrobiellen Peptide hBD-2 und hBD-3 in Soorösophagitis-Biopsien gegenüber den Kontroll-Biopsien signifikant (800-fach bzw. 20-fach) erhöht. Auch das Expressionsniveau von hBD-4, HD5 und HD6 war erhöht, auf Grund der niedrigen Transkriptzahlen kann hier jedoch nicht von einer signifikanten Erhöhung ausgegangen werden. HBD-1 wurde auf konstantem Niveau exprimiert.

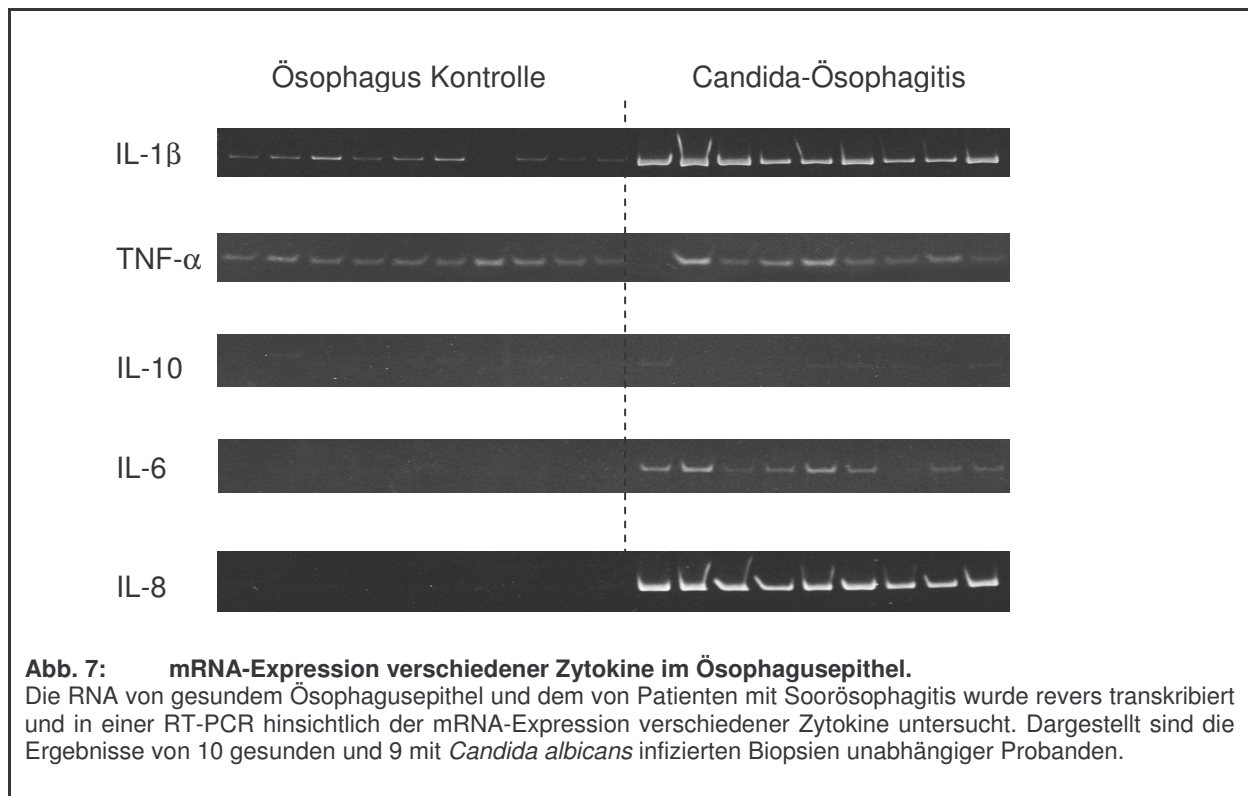


Um die Ergebnisse auch auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden Kryoschnitten von gesundem Ösophagusepithel und *Candida albicans*-befallenem Epithel mit Antikörpern gegen hBD-2 immunhistochemisch gefärbt. Dabei zeigte sich, dass hBD-2 in allen Schichten des Epithels exprimiert wurde (Abb. 6 A), und in *Candida albicans*-befallenen Epithelschnitten die Expression verstärkt war (Abb. 6 B).



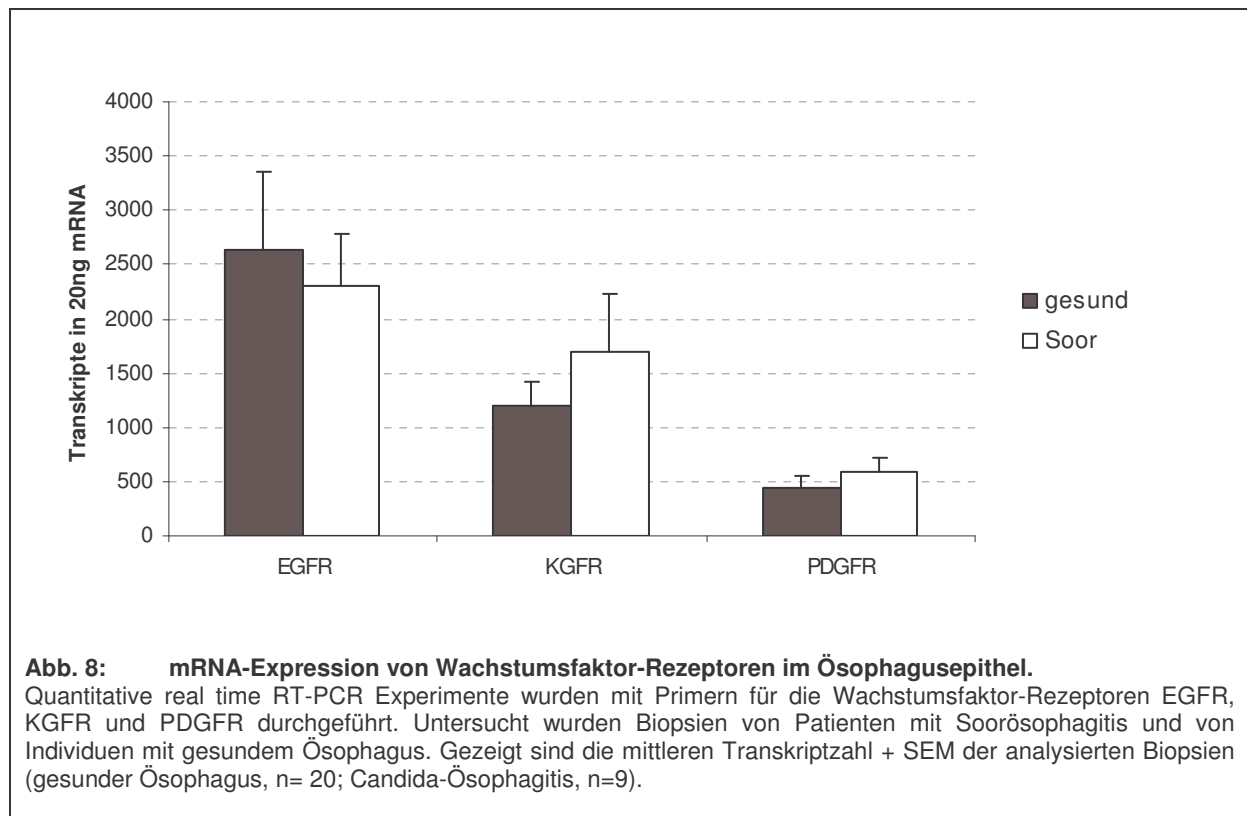
4.1.2 Zytokine

Zytokine sind wichtige Vermittler der erworbenen Immunität, als solche spielen sie gerade bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle. Um heraus zu finden, in wie weit Zytokine an den hier untersuchten Entzündungsprozessen beteiligt sind, sollte der Transkriptionslevel von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen mit Hilfe der RT-PCR untersucht werden. In gesundem Ösophagusepithel konnten geringe Mengen an $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ detektiert werden, während IL-6 , IL-8 und IL-10 gar nicht exprimiert wurden (Abb. 7). In *Candida albicans*-befallenem Ösophagusepithel konnte eine starke Induktion von $\text{IL-1}\beta$ und IL-8 nachgewiesen werden, etwas schwächer wurde IL-6 induziert. IL-10 war auch in *Candida albicans*-befallenen Geweben nicht nachweisbar, wohingegen $\text{TNF}\alpha$ konstant exprimiert wurde.



4.1.3 Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren haben für Wundheilungsprozesse und Differenzierungsvorgänge eine entscheidende Bedeutung. Damit eine Signalweiterleitung über diese Rezeptoren erfolgen kann, müssen diese in den Ösophagusepithelien vorhanden sein. Um diese Frage zu klären, wurde der mRNA-Expressionslevel der Wachstumsfaktor-Rezeptoren EGFR, KGFR und PDGFR in Ösophagusbiopsien untersucht. Verglichen wurden dabei Biopsien von gesunden Individuen mit Biopsien von Patienten mit Candida-Ösophagitis. Wie Abb. 8 zeigt, konnte der EGF-Rezeptor in den untersuchten Biopsien nachgewiesen werden, dabei blieb das Epressionsniveau, im Gegensatz zu dem der antimikrobiellen Peptide, relativ konstant. Auch die Rezeptoren für KGF und PDGF konnten in gesundem und in befallenem Epithel in relativ konstanten Mengen nachgewiesen werden.



4.2 *In vitro* Versuche mit ösophagealen Zelllinien

4.2.1 Etablierung eines *in vitro* Modells in ösophagealen Zellen

Um die Expressionsmechanismen der Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 im Ösophagus näher untersuchen zu können, musste zunächst eine geeignete Zellkulturlinie gefunden werden. Native Zellen konnten nicht verwendet werden, da nicht genug Material verfügbar war, um sinnvolle Versuchsreihen durchzuführen. Es wurden die folgenden Zelllinien hinsichtlich ihrer Defensinexpression in Vorversuchen getestet (Daten nicht gezeigt):

Colo680N ("oesophageal squamous carcinoma, black"),
KYSE ("oesophageal squamous carcinoma, japanese") (siehe 2.3.2) und
OE21 ("oesophageal squamous carcinoma, caucasian").

Von den getesteten Zelllinien war nur die oesophageale Karzinomzelllinie OE21 in der Lage die Defensine hBD-2 und hBD-3 nach Stimulation mit dem Zytokin $\text{TNF}\alpha$ signifikant zu induzieren (Abb. 9), dagegen wurde die hBD-1-Expression durch $\text{TNF}\alpha$ nicht beeinflusst.

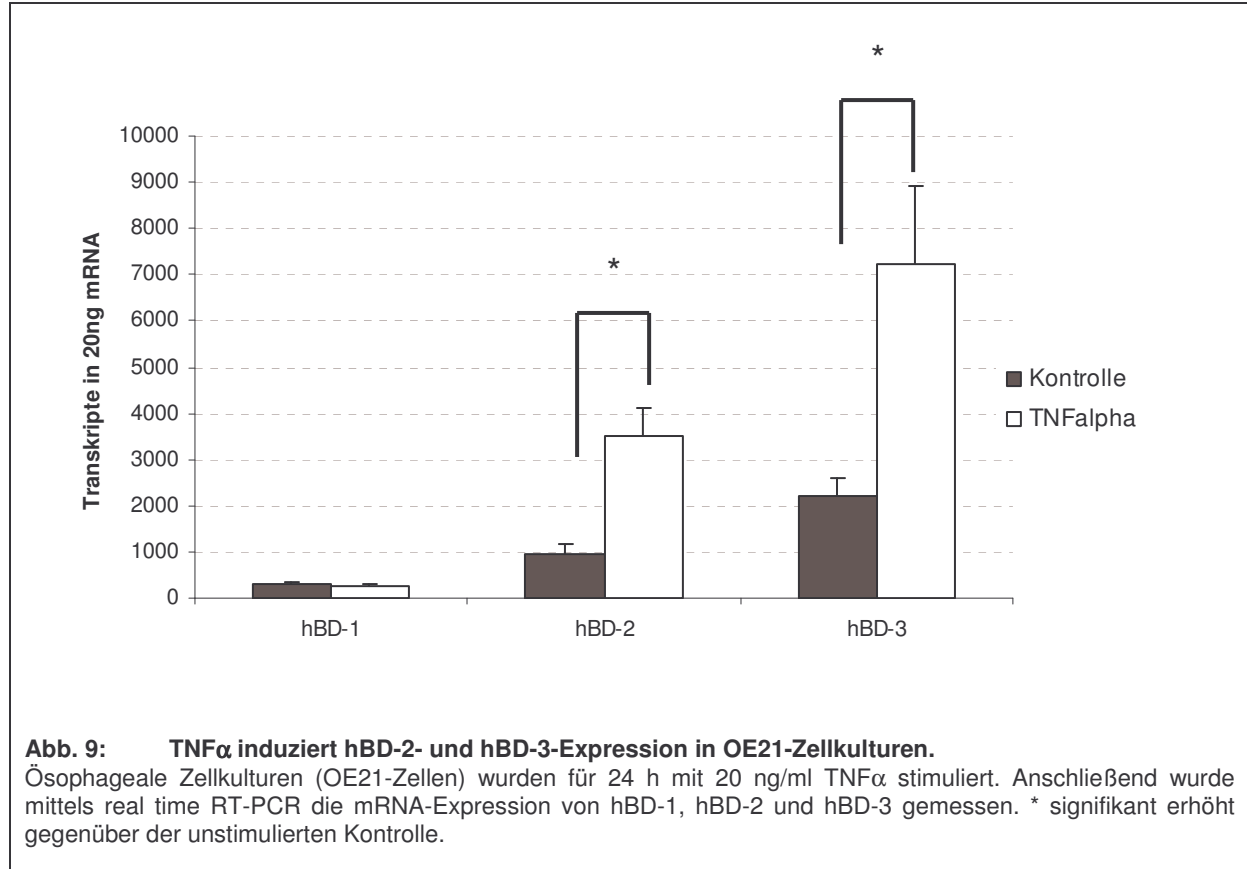
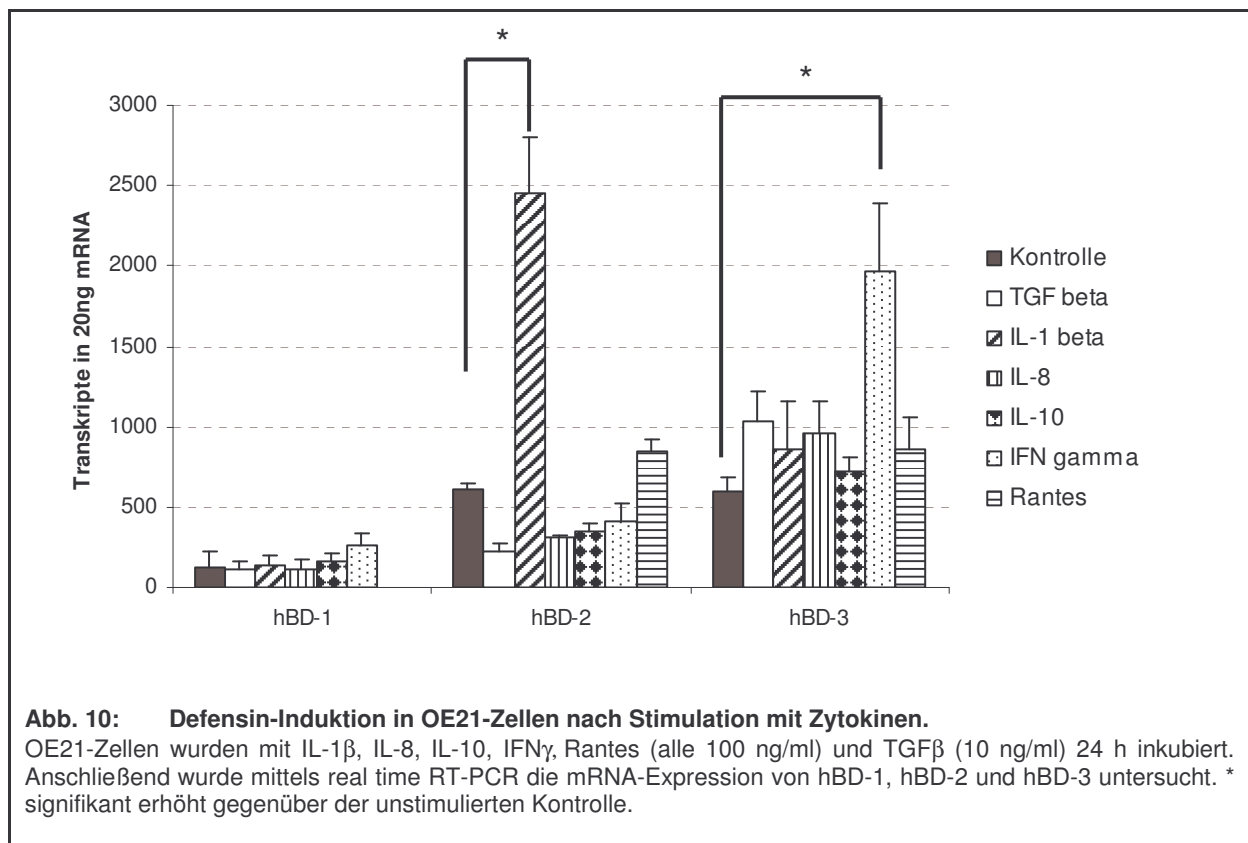


Abb. 9: $\text{TNF}\alpha$ induziert hBD-2- und hBD-3-Expression in OE21-Zellkulturen.

Ösophageale Zellkulturen (OE21-Zellen) wurden für 24 h mit 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Anschließend wurde mittels real time RT-PCR die mRNA-Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 gemessen. * signifikant erhöht gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

4.2.2 Zytokine induzieren Defensine in Ösophaguszellen

Das Zytokin TNF α ist in der Lage, die mRNA-Expression von Defensinen in Ösophagusepithelzellen zu induzieren (siehe Abb. 9). Um zu überprüfen, ob andere Zytokine ebenfalls in der Lage sind die mRNA-Expression der Defensine zu induzieren, wurden Stimulationsexperimente mit für epitheliale Entzündungsreaktionen relevanten Zytokinen an OE21-Zellen durchgeführt. Dazu wurden OE21-Zellen für 24 h mit den unterschiedlichen Zytokinen inkubiert und die mRNA-Expression anschließend in real time RT-PCR Experimenten bestimmt. Die Ergebnisse in Abb. 10 zeigen, dass hBD-2 durch IL-1 β signifikant induziert wurde, während die übrigen Zytokine keinen Einfluss auf die hBD-2-Expression hatten. Das hBD-3-Expressionsniveau wurde nur durch Inkubation mit IFN γ deutlich erhöht, dagegen blieb das hBD-1-Expressionsniveau nach Inkubation mit den getesteten Zytokinen konstant.



4.2.3 Wachstumsfaktoren induzieren Defensine *in vitro*

Um zu testen ob Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF α in der Lage sind, die Defensine in OE21-Zellen zu induzieren, wurden OE21-Zellen für 24 h mit 100 ng/ml EGF und 50 ng/ml TGF α inkubiert und anschließend die Transkriptzahlen der Defensine ermittelt. Wie Abb.11 zeigt, wurde die mRNA-Expression von hBD-2 und hBD-3 signifikant induziert, während die hBD-1-Expression durch Inkubation mit EGF und TGF α nicht beeinflusst wurde. Andere Wachstumsfaktoren, wie KGF, PDGF oder HGF induzierten die Expression der Defensine nicht (Daten nicht gezeigt).

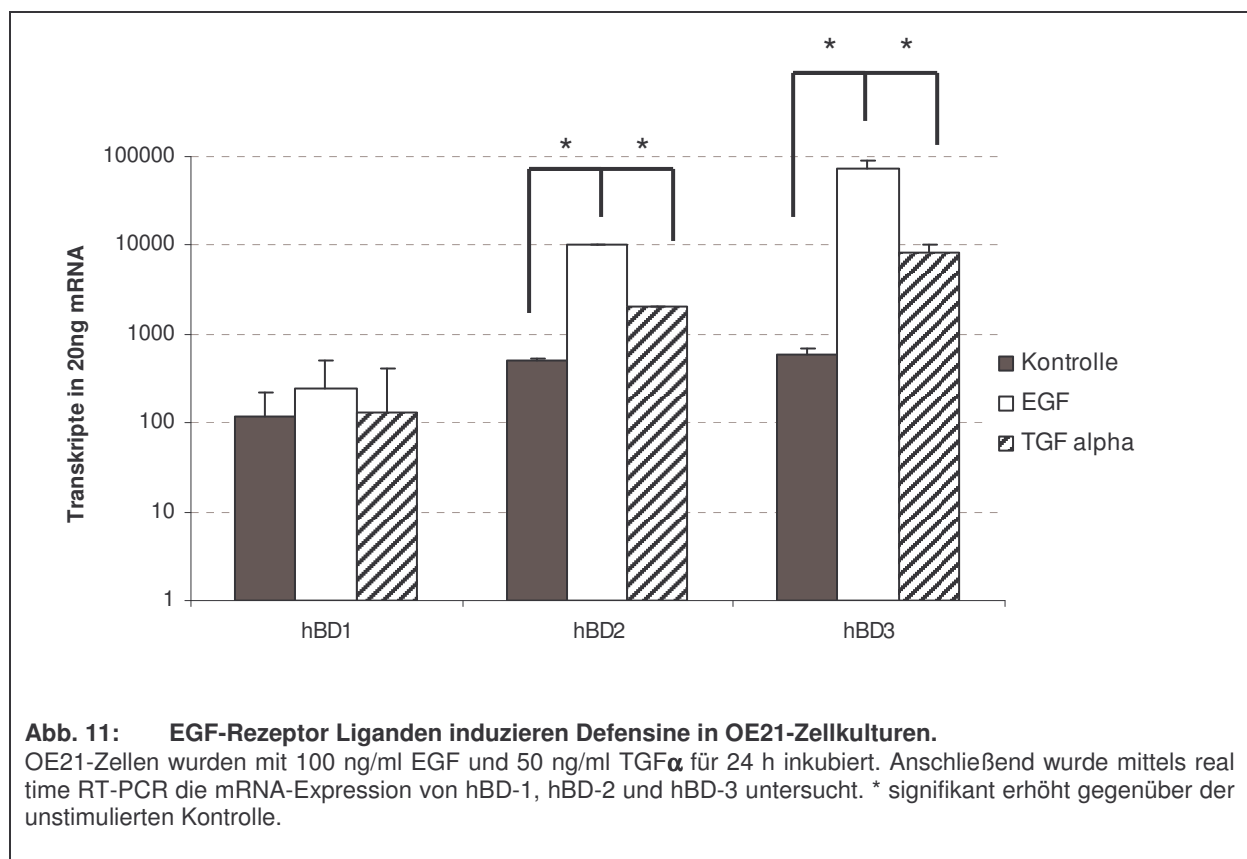
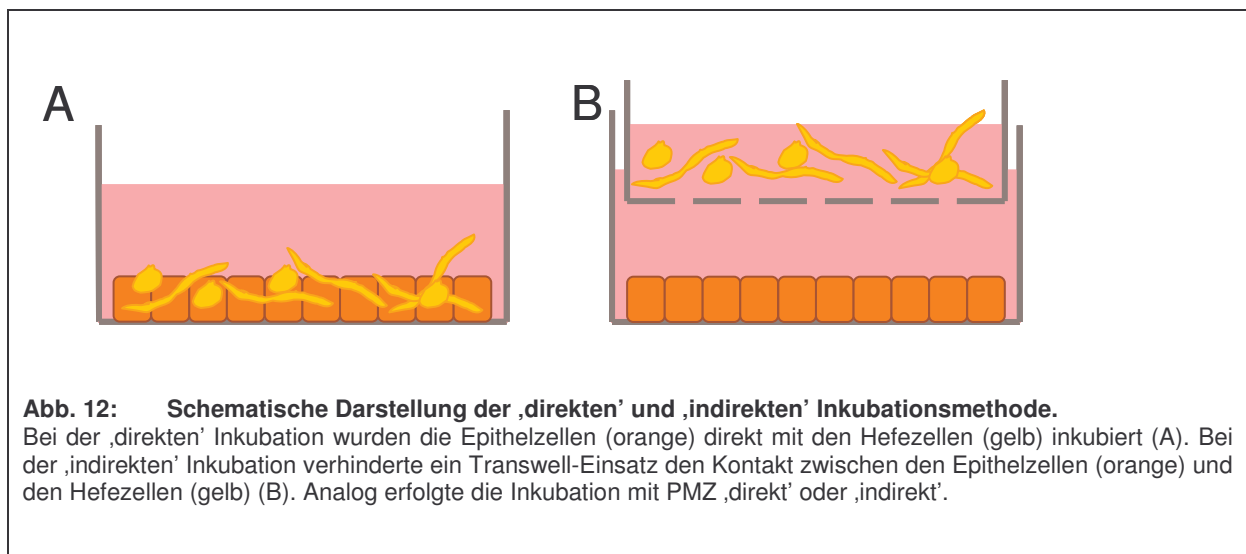


Abb. 11: EGF-Rezeptor Liganden induzieren Defensine in OE21-Zellkulturen.

OE21-Zellen wurden mit 100 ng/ml EGF und 50 ng/ml TGF α für 24 h inkubiert. Anschließend wurde mittels real time RT-PCR die mRNA-Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 untersucht. * signifikant erhöht gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

4.2.4 Stimulation von OE21-Zellen mit vitalen *Candida albicans*

Die Expression der Defensine hBD-2 und hBD-3 wird im Rahmen einer *Candida albicans*-Infektion des Ösophagus induziert (Abb. 5). In Stimulationsexperimenten sollte getestet werden, ob die Defensine auch in der verwendeten Zelllinie nach Inkubation mit *Candida albicans* exprimiert werden. Dazu wurden OE21-Zellen für 24 h mit *Candida albicans*-Suspensionskulturen (1×10^4 *C. albicans*-Zellen/ml, 3.2.1) in Zellkulturmedium inkubiert. Die Inkubation sollte „direkt“ und „indirekt“ erfolgen. Bei der „direkten“ Stimulation wurden die in Suspension wachsenden Hefen direkt zu den adhärent wachsenden OE21-Zellen gegeben (siehe Abb. 12 A & 3.2.3.3.). Ein Transwell-Einsatz verhinderte bei der „indirekten“ Stimulation, dass die *C. albicans*-Zellen Zellkontakt zu den OE21-Zellen herstellen konnten (siehe Abb. 12 B & 3.2.3.3.). Nur lösliche Substanzen der Hefezellen konnten bei dieser Stimulationsmethode zu den Epithelzellen gelangen. Nach 24 h wurde die mRNA-Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 mittels real time RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass nur die mRNA-Expression von hBD-3 durch „indirekte“ Stimulation mit *Candida albicans* schwach induziert wurde (Abb. 13), während die anderen Defensine nicht induziert wurden.



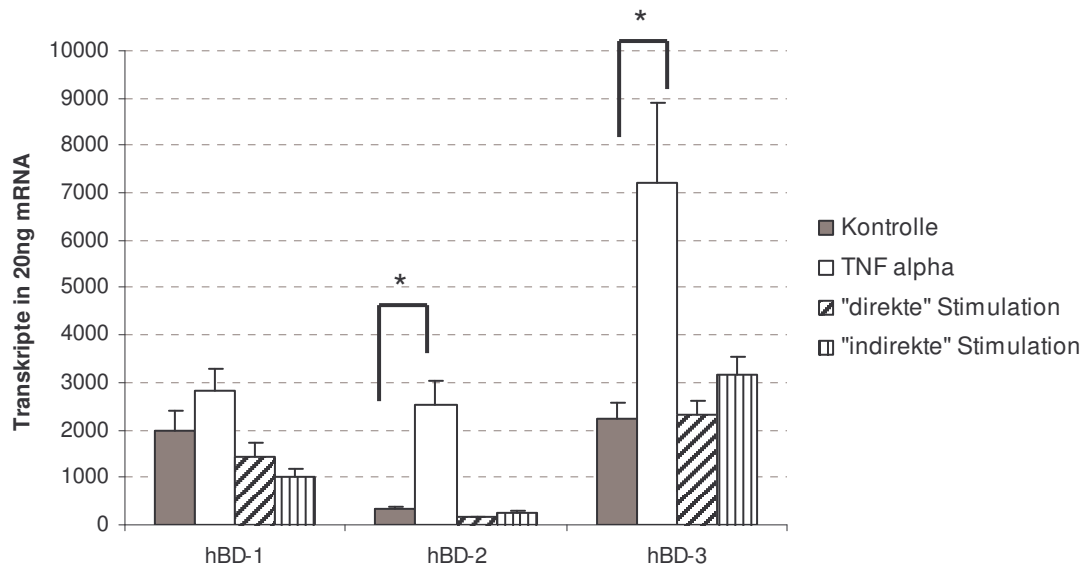
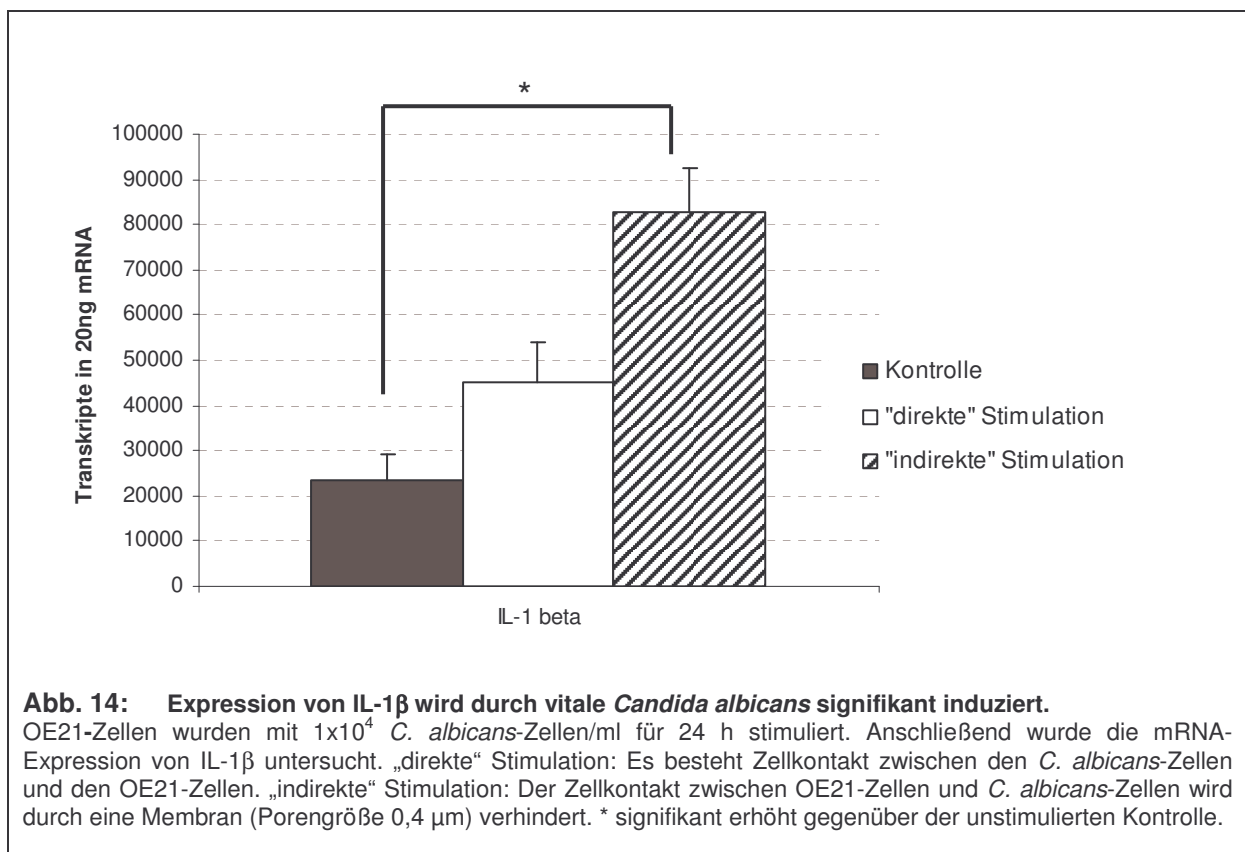


Abb. 13: Expression von hBD-2 und hBD-3 wird durch vitale *Candida albicans* nur gering induziert.

OE21-Zellen wurden mit 1×10^4 *C. albicans*-Zellen/ml für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels real time RT-PCR die mRNA-Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 untersucht. Direkte Stimulation: Es besteht Zellkontakt zwischen den *C. albicans*-Zellen und den OE21-Zellen. Indirekte Stimulation: Der Zellkontakt zwischen OE21-Zellen und *C. albicans*-Zellen wird durch eine Membran (Porengröße 0,4 μm) verhindert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 24 h mit 20 ng/ml TNF α inkubiert. * signifikant erhöht gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

Die in vivo Analysen der Soorbiopsien haben gezeigt, dass in den von Hefe-befallenen Geweben die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 erhöht ist (Abb. 7). Um zu testen, ob die Inkubation mit lebenden Hefezellen auch in der verwendeten oesophagealen Zelllinie zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen führt, wurde das Expressionsniveau von IL-1 β , TNF α und IL-8 an cDNA-Proben von OE21-Zellen analysiert, die mit *Candida albicans* „direkt“ und „indirekt“ inkubiert worden waren. Es zeigte sich eine signifikante Induktion der IL-1 β -Expression nach „indirekter“ Stimulation mit vitalen *Candida albicans* (Abb. 14). Nach „direkter“ Stimulation war ebenfalls eine Induktion der IL-1 β -Expression nachweisbar, jedoch in geringerem Maße als durch „indirekte“ Stimulation. Für andere Zytokine wie IL-8 und TNF α war eine Expression nach Inkubation mit *Candida albicans* nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).



4.2.5 Überstände von *Candida albicans*-Kulturen induzieren Defensine

Die Konzentration von *Candida albicans* konnte bei der Inkubation mit den lebenden Hefezellen nicht erhöht werden, da diese ansonsten toxisch auf die Epithelzellen gewirkt hätten. Um dennoch eine Konzentrationserhöhung zu erreichen, wurden Überstände von *C. albicans*-Zellen hergestellt, mit denen anschließend OE21-Zellen inkubiert wurden. Für die Überstände wurden *Candida albicans*-Zellen der Konzentration 1×10^4 Zellen/ml für 48 h in Zellkulturmedium inkubiert und anschließend aus dem Medium herausgefiltert (3.2.1). Mit diesem Überstand wurden die ösophagealen OE21-Zellen für weitere 24 h inkubiert. Wie Abb. 15 zeigt, resultierte dies in einer verstärkten Expression von hBD-2 und hBD-3 gegenüber dem Kontrollansatz mit Zellkulturmedium und gegenüber der Inkubation mit lebenden *Candida albicans*-Suspensionskulturen (Abb. 13).

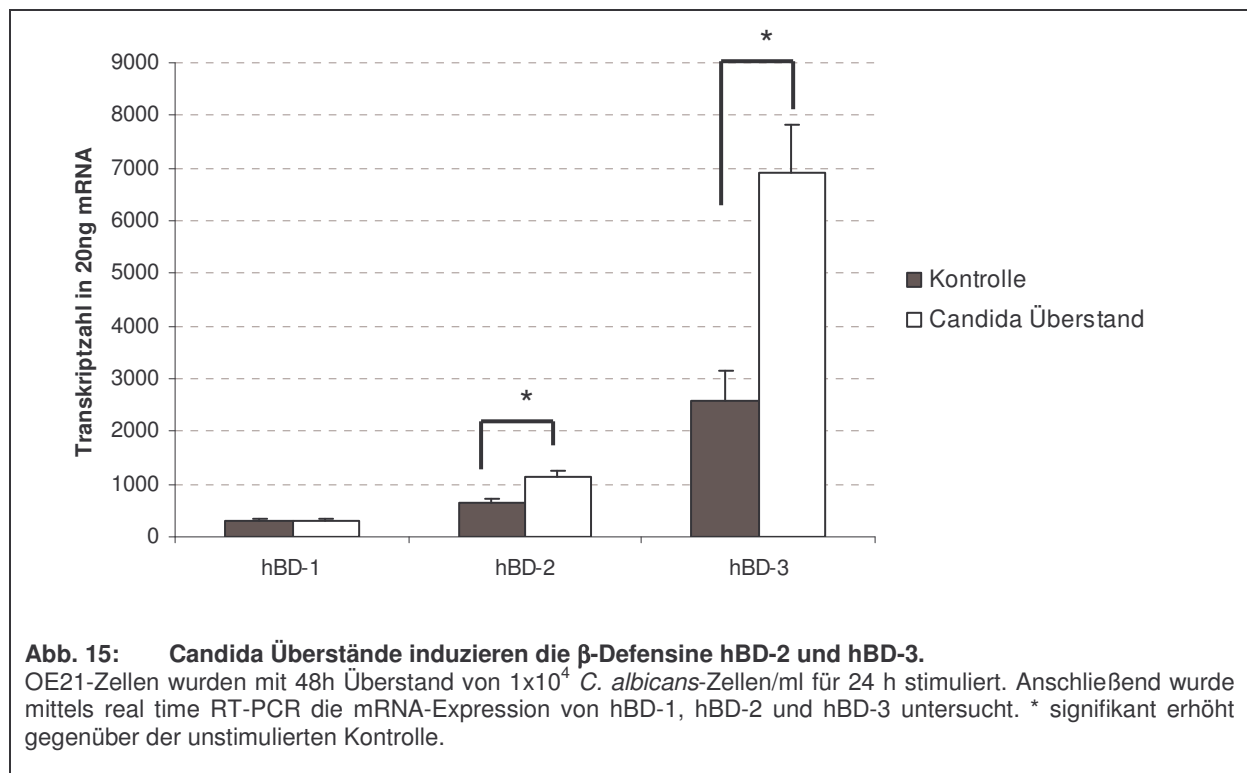


Abb. 15: Candida Überstände induzieren die β -Defensine hBD-2 und hBD-3.

OE21-Zellen wurden mit 48h Überstand von 1×10^4 *C. albicans*-Zellen/ml für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels real time RT-PCR die mRNA-Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 untersucht. * signifikant erhöht gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

4.2.6 Kostimulation mit *Candida albicans* und polymorphonukleären Zellen (PMZ) induziert hBD-2 und hBD-3

In dem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel des Ösophagus halten sich zahlreiche weiße Blutzellen (Leukozyten) wie Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen auf. Zusätzlich kommt es während Entzündungsprozessen zu einer massiven Einwanderung einer großen Anzahl von Leukozyten in das mehrschichtige Epithel. Mit dem folgenden Versuch sollte getestet werden, ob und in wie weit aus peripherem Blut isolierte polymorphonukleäre Zellen (PMZ) an der Induktion von Defensinen im Ösophagusepithel beteiligt sind. Dazu wurden OE21-Zellen mit frisch isolierten PMZ (Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) und vitalen *Candida albicans* für 24 h inkubiert und anschließend die mRNA-Expression mittels real time RT-PCR Experimenten analysiert. Die in Abb. 16 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die hBD-2- und hBD-3-mRNA-Expression durch Kostimulation mit PMZ („direkt“) und *Candida albicans* („indirekt“) signifikant induziert wurde. Die umgekehrte Stimulation mit direktem *Candida albicans* Kontakt und indirekter PMZ Anwesenheit im Zellkulturmedium führte nur zu einer geringeren Induktion der mRNA-Expression. Die Stimulation mit *Candida albicans* oder PMZ alleine zeigte ebenfalls geringfügigere Induktionen.

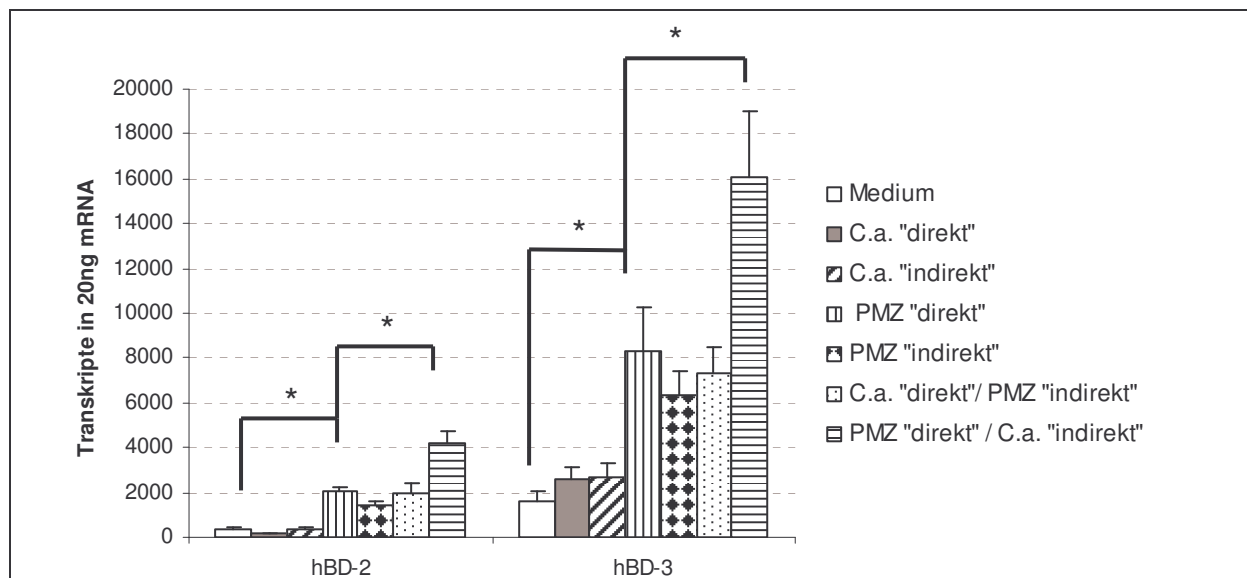
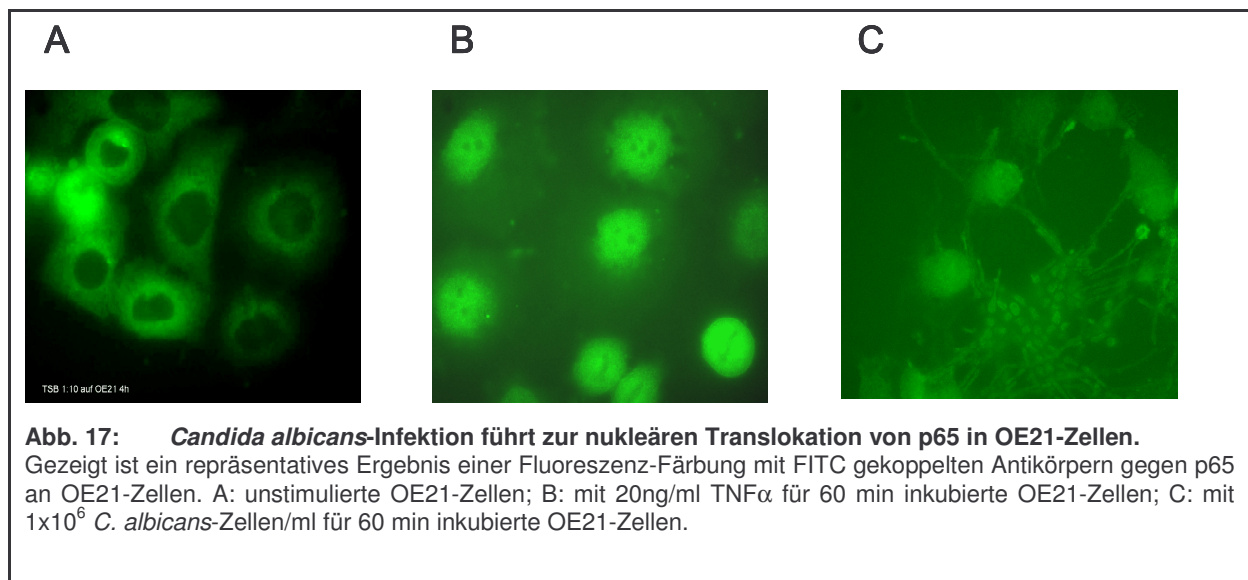


Abb. 16: Kostimulation von OE21-Zellen mit PMZ und *Candida albicans* induziert hBD-2 und hBD-3-Induktion.

OE21-Zellen wurden mit $0,5 \times 10^4$ *C. albicans*-Zellen/ml und/oder $0,5 \times 10^6$ PMZ für 24 h stimuliert. Anschließend wurde mittels real time RT-PCR die mRNA-Expression von hBD-2 und hBD-3 untersucht. „direkte“ Stimulation: Es besteht Zellkontakt zwischen Zellen. „indirekte“ Stimulation: Der Zellkontakt zwischen OE21-Zellen und *C. albicans*-Zellen oder PMZ wird durch eine Membran (Porengröße $0,4 \mu\text{m}$) verhindert. * signifikant erhöht gegenüber den unstimulierten Zellen als Kontrolle.

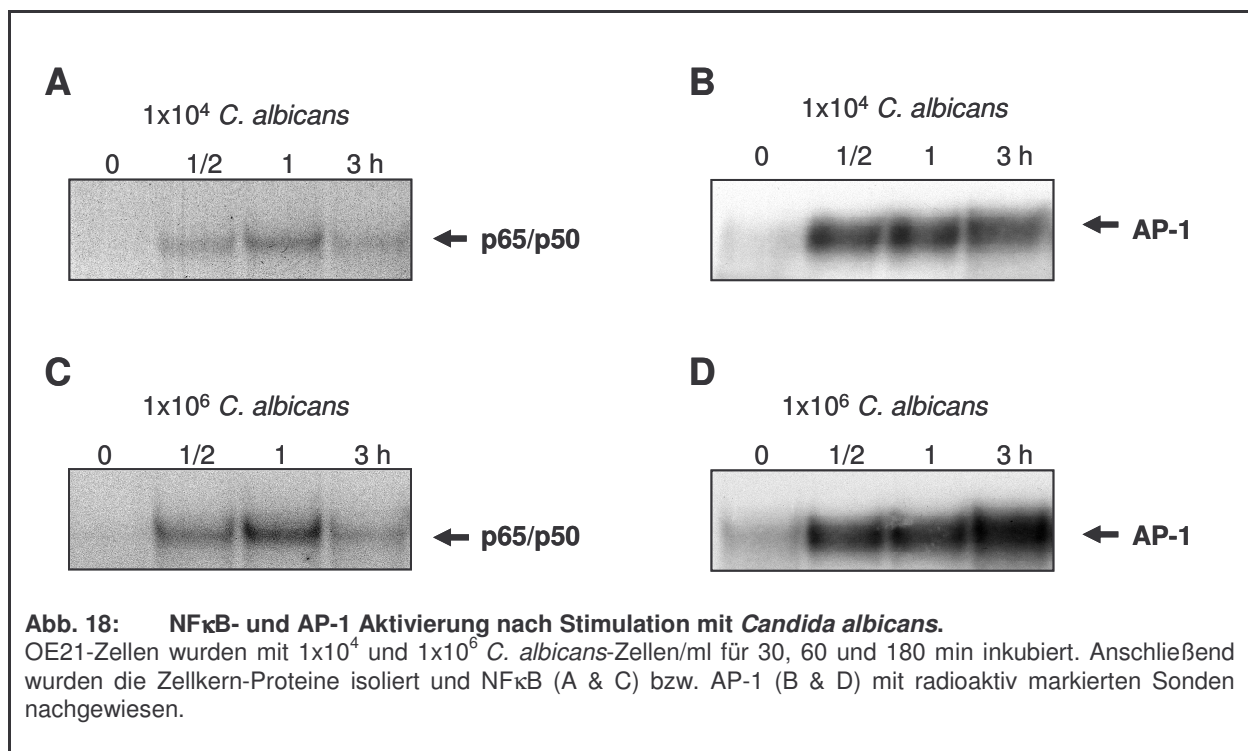
4.2.7 Transkriptionsfaktor NF κ B wird durch *Candida albicans*-Infektion aktiviert

Die Kopplung eines Immunfluoreszenz-Farbstoffes an einen Antikörper gegen p65, eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF κ B, ermöglicht die Färbung dieser Untereinheit und ihre Lokalisation in der Zelle mittels Fluoreszenz-Mikroskop. Im inaktiven Zustand sollte p65 im Zytoplasma vorliegen, nach seiner Aktivierung transloziert es in den Zellkern und sollte dort nachweisbar sein. Auf diese Weise kann eine mögliche Aktivierung von NF κ B durch die Hefezellen mittels Immunfärbung nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden OE21-Zellen mit vitalen *Candida albicans*-Zellen für 6 h inkubiert und die p65-Translokation anschließend mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen p65 nachgewiesen. Abbildung 17 C zeigt, dass die Inkubation mit vitalen *Candida albicans* zu einer Aktivierung von NF κ B und damit zur nukleären Translokation von p65 führte. Der Zellkern ist durch das FITC-markierte p65 grün gefärbt. Im unstimulierten Zustand liegt NF κ B inaktiv, an I κ B α gebunden, im Zytoplasma vor (Abb. 17 A). Daher erscheint der Zellkern dunkel, die Fluoreszenz-Färbung findet sich im Zytoplasma der OE21 Zellen. Als Positivkontrolle wurden die OE21-Zellen mit TNF α inkubiert, einem bekannten Aktivator von NF κ B. Auch hier ist der fluoreszierende Zellkern deutlich zu erkennen (Abb. 17 B).



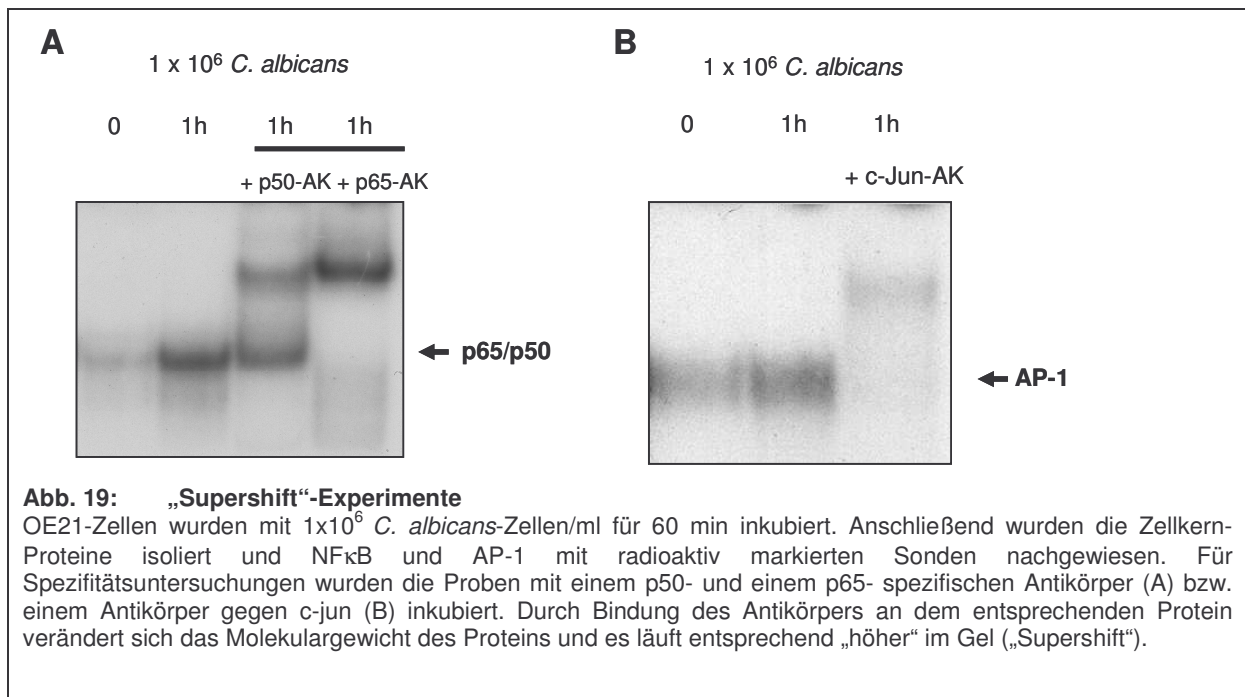
4.3 „Gel-shift“-Analysen

Mit dem „Electrophoresis mobility shift assay“ (EMSA) kann die Bindungsaktivität und die Präsenz von Proteinen an der DNA nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob NF κ B und/oder AP-1 durch *Candida albicans*-Stimulation aktiviert werden und an der DNA im Zellkern binden können, wurden OE21-Zellen für verschiedene Zeitspannen mit unterschiedlichen Konzentrationen an vitalen *Candida albicans* inkubiert. Anschließend wurden die Zellkernproteine der Zellen isoliert und NF κ B bzw. AP-1 mittels komplementärer, radioaktiv markierter Sonden in EMSA-Experimenten nachgewiesen. Die Ergebnisse in Abb. 18 zeigen, dass NF κ B und AP-1 durch Stimulation mit *Candida albicans* aktiviert wurden. Bindungsfähiges NF κ B war 30 min nach Inkubationsbeginn bereits nachweisbar und seine Konzentration erreichte nach 60 min einen Höhepunkt. Nach 3h Inkubation war NF κ B im Zellkern nur noch minimal nachweisbar (Abb. 18 A und C). Die nukleäre Konzentration an DNA-bindungsfähigem AP-1 erreichte nach 3h Inkubation ihr Maximum (Abb. 18 D). Beide Transkriptionsfaktoren wurden durch höhere *Candida albicans*-Konzentrationen (1×10^6 Zellen/ml (Abb. 18 C und D) gegenüber 1×10^4 Zellen/ml (Abb. 18 A und B)) stärker aktiviert.

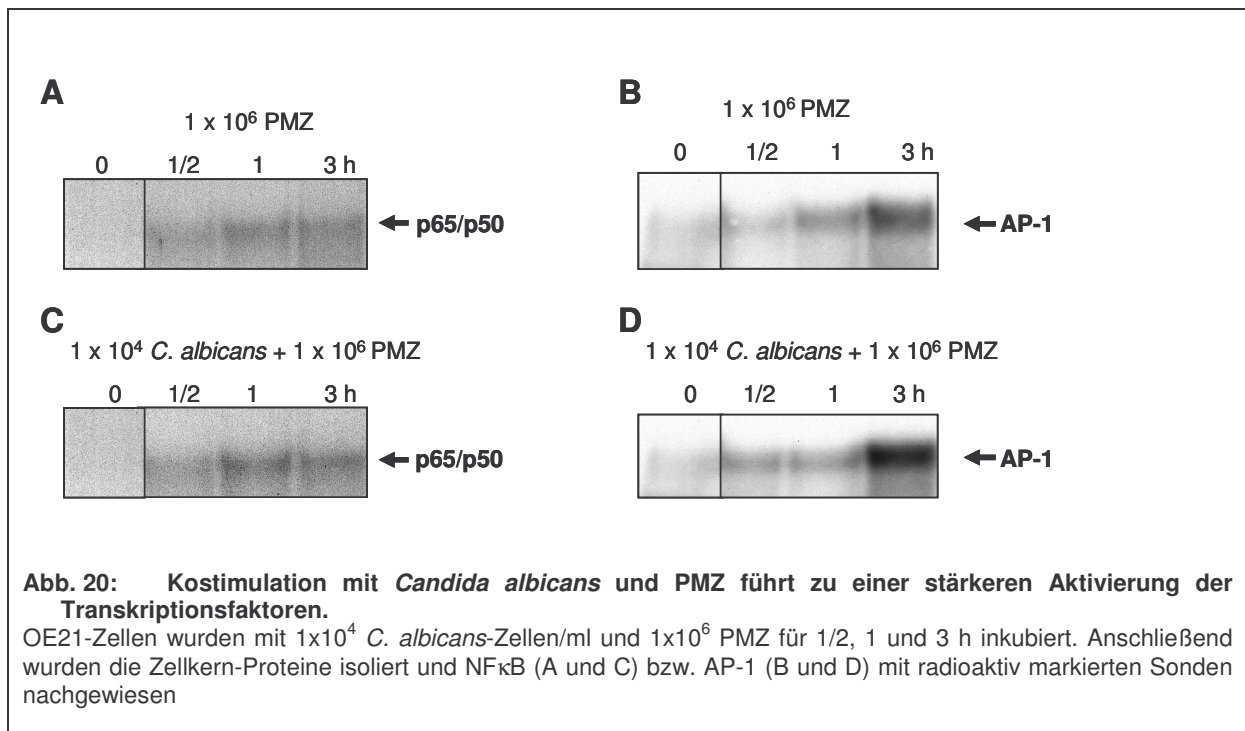


Ergebnisse

Für Spezifitätsuntersuchungen wurde je eine Probe zusätzlich mit einem Antikörper gegen die p50- und die p65-Untereinheit von NF κ B (Abb. 19 A) oder gegen c-jun (Abb. 19 B) inkubiert und anschließend mittels „Gel-shift“ nachgewiesen. Bindung des Antikörpers an dem entsprechenden Protein vergrößert dessen Molekulargewicht und somit verändert sich auch sein Laufverhalten. Die Banden der Proteine lagen nach Antikörperbindung deutlich oberhalb der ursprünglichen Banden, was einem größeren Molekulargewicht entspricht („Supershift“). Damit wurde bestätigt, dass die verwendete Sonde einen NF κ B-Komplex bestehend aus p65-(RelA) und p50-Untereinheit bindet und AP-1 in diesem Fall aus einem c-jun Homodimer besteht.



Um den Einfluss der Koinkubation von OE21-Zellen mit PMZ und *Candida albicans* auf die Aktivierung der beiden Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 zu untersuchen, wurden EMSA-Untersuchungen an entsprechend stimulierten OE21-Zellen durchgeführt. Inkubation von OE21-Zellen mit PMZ resultierte in einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren. NFκB war in einem Zeitraum von 30 min Inkubation bis 3 h Inkubation im Zellkern nachweisbar (Abb. 20 A), die nukleäre Konzentration an DNA-bindungsfähigem AP-1 war nach 3 h am höchsten (Abb. 20 B). Koinkubation mit *Candida albicans* und PMZ resultierte in den gleichen Zeiträumen in einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, jedoch war die nukleäre Konzentration deutlich höher, als bei alleiniger Inkubation mit PMZ (Abb. 20 C und D).

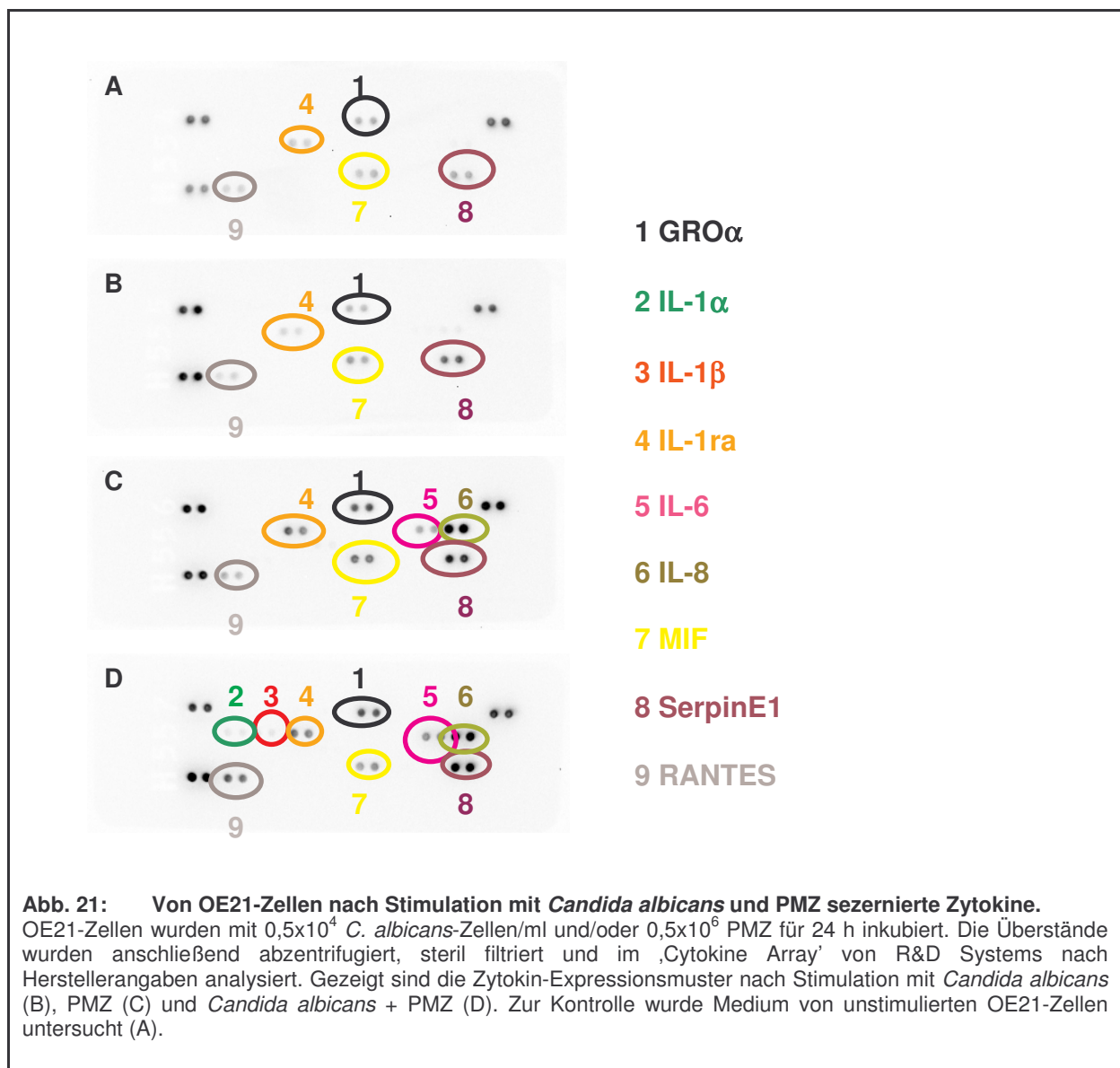


4.4 Zytokinanalyse

Zytokine sind wichtige Botenstoffe des Immunsystems. Sie werden unter anderem von PMZ freigesetzt, um lokale und systemische Reaktion zu bewirken und weitere Komponenten des Immunsystems zu aktivieren. Um festzustellen, ob die synergistische Induktion der hBD-2- und hBD-3-Expression nach Stimulation mit *C. albicans* und PMZ aus Abschnitt 4.2.6. auf der Wirkung von Zytokinen beruht, sollten die Überstände der stimulierten Zellen auf ihre Zytokin-Expressionsmuster untersucht werden. Dazu wurden die Überstände von Zellen gewonnen, die zuvor 24 h mit *Candida albicans* („indirekt“), mit PMZ („direkt“) oder mit *Candida albicans* („indirekt“) und PMZ („direkt“) stimuliert worden waren. Diese Überstände

wurden im ‚Cytokine Array‘ von R&D Systems analysiert. Als Kontrolle diente der Überstand von unstimulierten Zellen.

Unstimulierte OE21-Zellen exprimierten hauptsächlich Chemokine, wie Gro α , MIF, Rantes und SerpinE1 (Abb. 21 A). Inkubation mit *Candida albicans* führte nicht zu signifikanten Veränderungen im getesteten Zytokin-Profil (Abb. 21 B). Dagegen resultierte die Inkubation mit PMZ in einer verstärkten Expression von Gro α , MIF und SerpinE1, zusätzlich wurden IL-6 und IL-8 freigesetzt (Abb. 21 C). Die Kostimulation mit *Candida albicans* und PMZ (Abb. 21 D) führte zu einer gesteigerten Freisetzung von Rantes und einer minimalen Freisetzung von IL-1 α und IL-1 β .

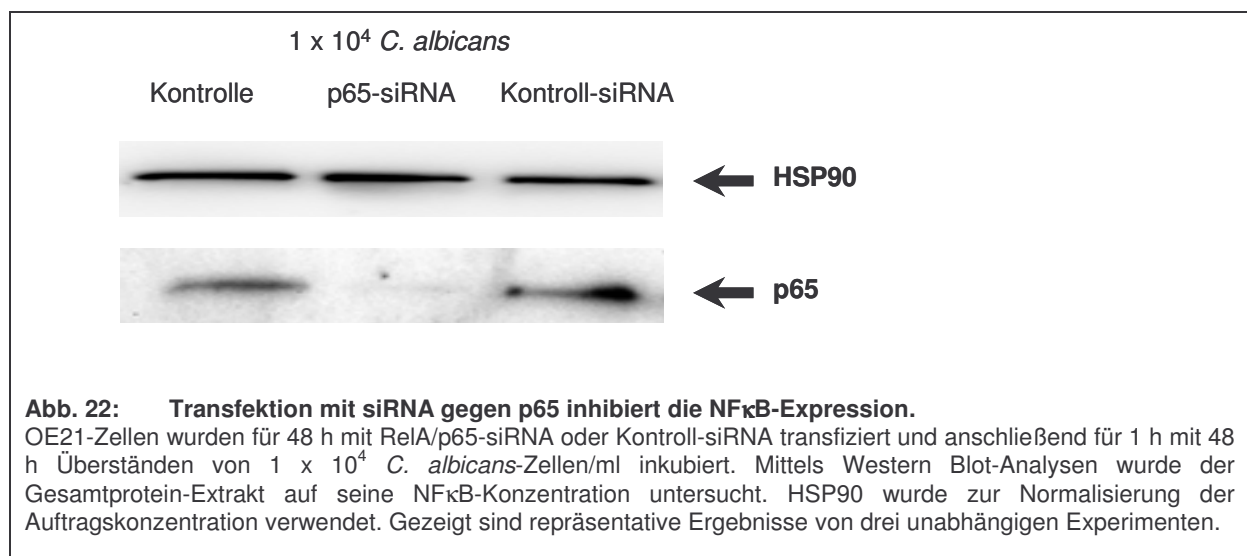


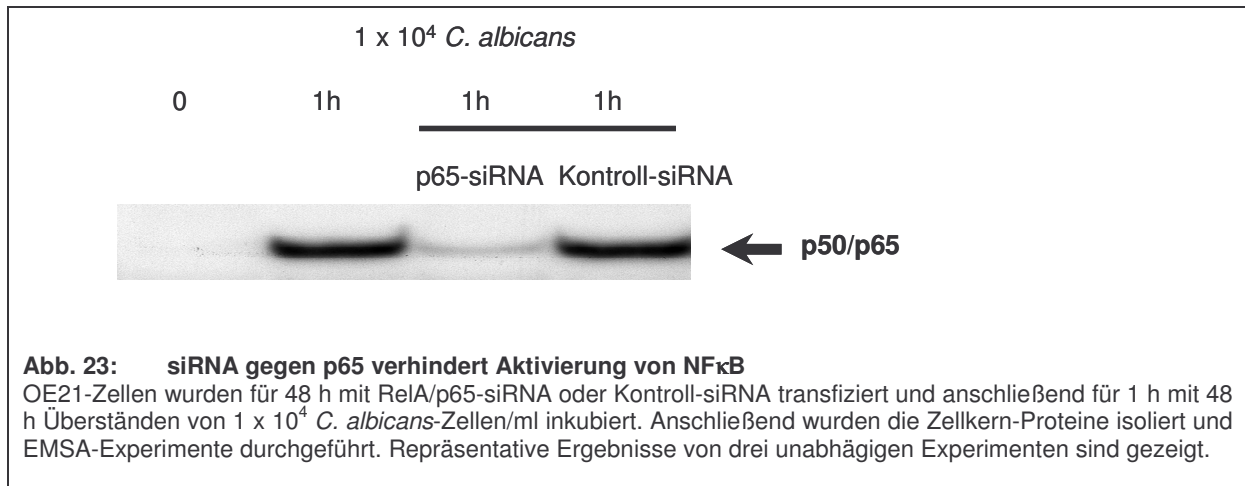
4.5 Identifizierung relevanter Signalkaskaden der Defensininduktion

Candida albicans-Infektion des Ösophagusepithels führt zur Aktivierung spezifischer Signaltransduktionskaskaden, die letztlich zu der Expression von Defensinen führen (siehe 4.1). Um nähere Informationen über die aktivierten Kaskaden zu erhalten, sollten Schlüsselstelle einzelner Signaltransduktionskaskaden unterbrochen werden, um ihre Relevanz bei der Aktivierung der Defensine aufzuzeigen. Wie in Abb. 3 gezeigt, wurde die Signalweiterleitung über den Transkriptionsfaktors NF κ B durch Einsatz von p65 spezifischer siRNA verhindert. EGF-Rezeptor abhängige Kaskaden wurden durch Antikörper gegen den Rezeptor selbst unterbrochen oder durch einen Kinaseinhibitor, der die Autophosphorylierung des Rezeptors verhindert. Die MAPK-Kaskaden wurden durch spezifische Kinaseinhibitoren an der Signalweiterleitung gehindert. Die Relevanz der einzelnen Kinasen sollte sich in einem Abfall der betroffenen Defensin-Transkription zeigen.

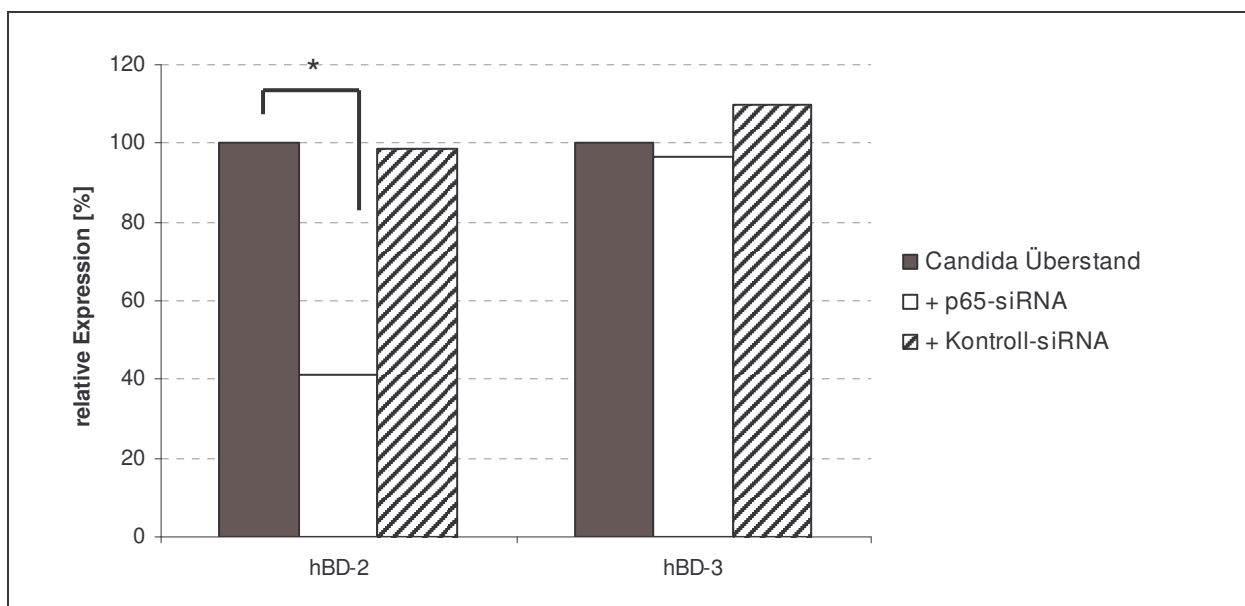
4.5.1 NF κ B ist für hBD-2-Induktion nach *Candida albicans*-Infektion notwendig

Um die mögliche Beteiligung von NF κ B an der *C. albicans* induzierten hBD-Expression zu evaluieren, wurden OE21-Zellen mit siRNA gegen RelA/p65 bzw. Kontroll-siRNA transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit *C. albicans*-Überständen für eine weitere Stunde inkubiert und analysiert. Die Transfektion der Zellen führte zu einem signifikanten Rückgang der Expression von RelA/p65 (Abb. 22). Des Weiteren wurde die Induktion von NF κ B durch *Candida albicans* auf diese Weise inhibiert, was EMSA-Experimente zeigten (Abb. 23).



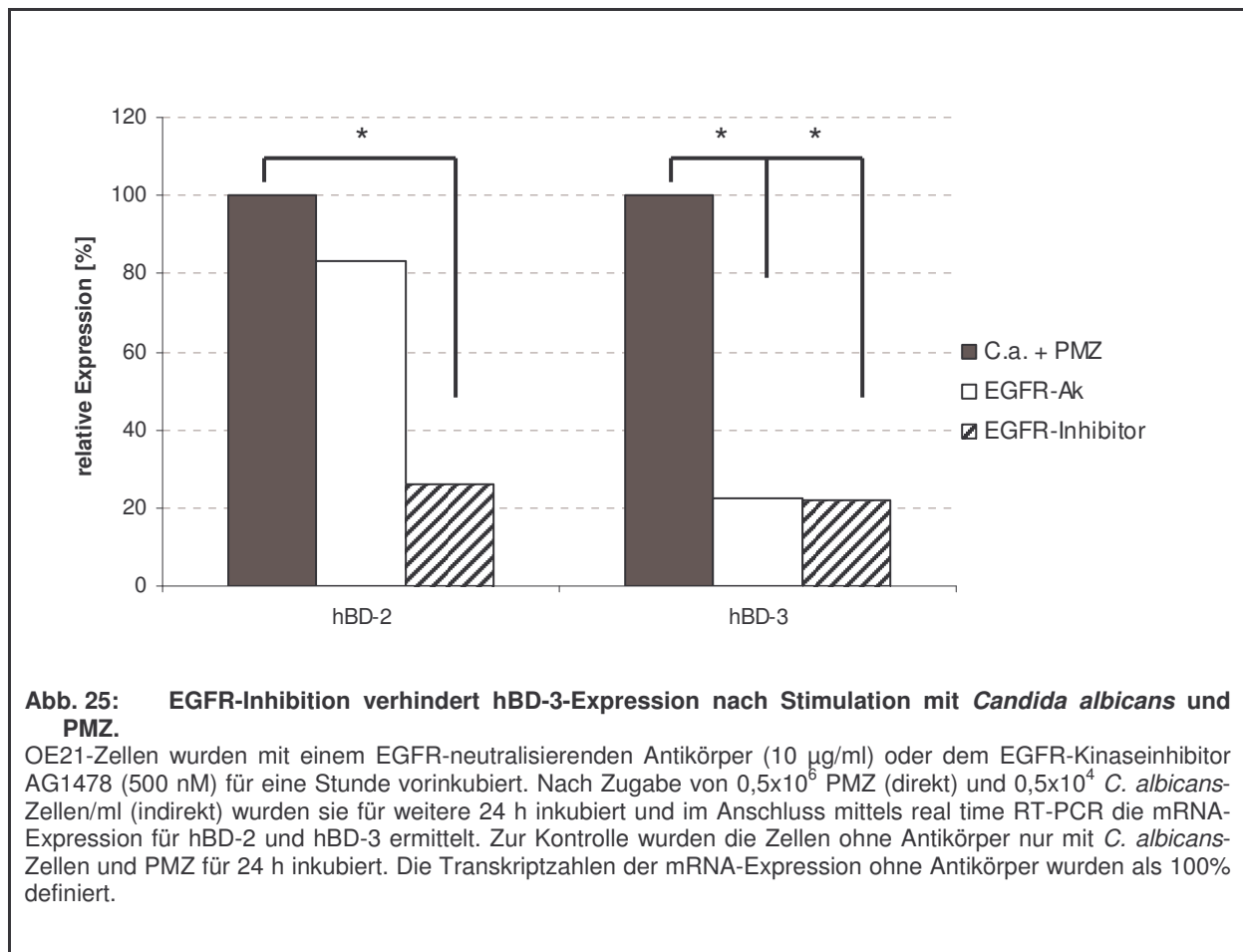


Die Inhibierung der NFκB Aktivierung führte zu einer deutlichen Reduktion der *Candida albicans*-induzierten hBD-2-mRNA-Expression, während das hBD-3-Expressionsniveau nicht signifikant beeinflusst wurde (Abb. 24). Die Kontroll-siRNA zeigte in beiden Fällen keine Wirkung auf die mRNA Transkription. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Transkriptzahlen der OE21-Zellen ohne siRNA gleich 100% gesetzt, und die prozentuale Expression der verwendeten siRNA entsprechend berechnet.



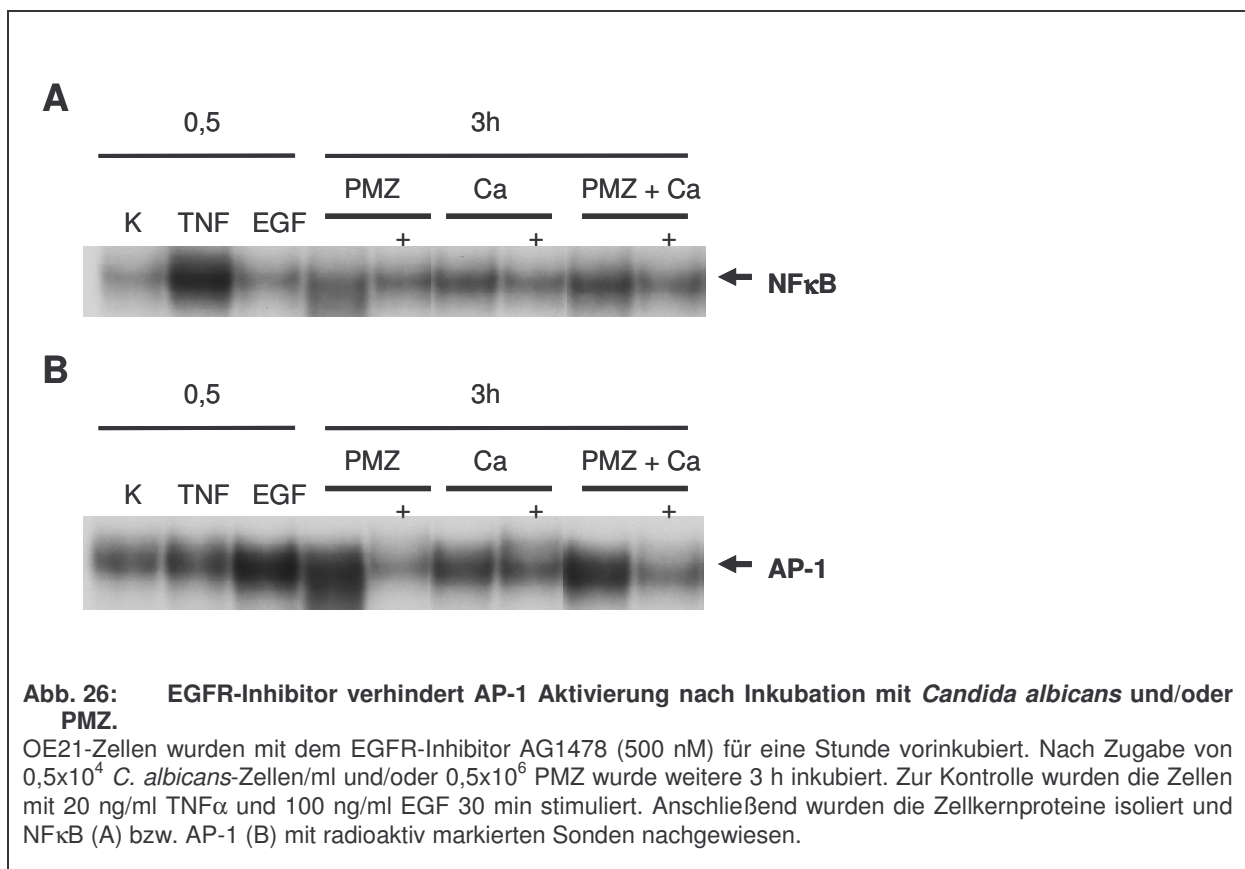
4.5.2 EGF-Rezeptor ist für hBD-3-Induktion notwendig

Um zu untersuchen, welche Relevanz der EGF-Rezeptor auf die Defensinexpression nach *Candida albicans*-Infektion hat wurden die ösophagealen Zellen zusätzlich mit einem den EGFR-neutralisierenden Antikörper oder einem EGFR-Kinaseinhibitor inkubiert. Die anschließend ermittelte mRNA-Expression ergab, dass das durch *Candida albicans* und PMZ induzierte hBD-3 Signal durch den EGFR-Antikörper und den Kinaseinhibitor fast vollständig inhibiert wurde (Abb. 25). Die hBD-2-Expression wurde durch den Kinaseinhibitor ebenfalls fast vollständig inhibiert, dagegen resultierte der Einsatz des EGFR-neutralisierenden Antikörpers nur in einem 20%igen Rückgang der Expression. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Transkriptzahlen der OE21-Zellen ohne Inhibitor gleich 100% gesetzt, und die Expression des verwendeten Inhibitors entsprechend berechnet.



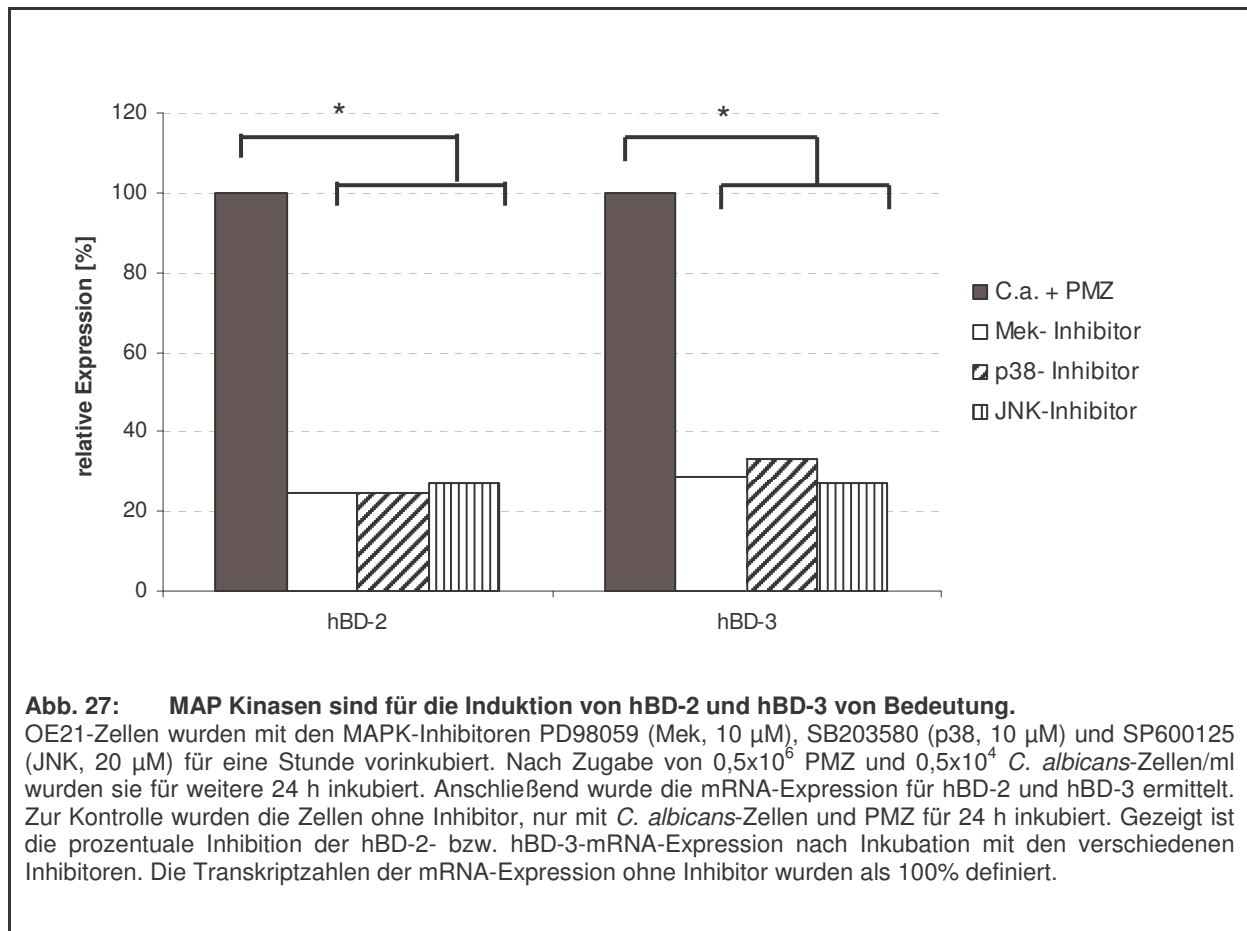
Um die Auswirkungen der EGFR-Inhibition auf die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 zu untersuchen, wurden Gel-shift Analysen der Zellkernproteine durchgeführt. Dazu wurden die OE21-Zellen für 1 h mit dem EGFR-Inhibitor vorinkubiert und anschließend für weitere 3 h zusätzlich mit PMZ, *Candida albicans* oder PMZ und *Candida albicans* inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellkernproteine der Zellen isoliert und NFκB bzw. AP-1 mittels komplementärer, radioaktiv markierter Sonden nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden die Zellen ohne Inhibitoren inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NFκB durch *Candida albicans*, PMZ und Kostimulation von *Candida albicans* und PMZ aktiviert wurde (Abb. 26 A). Der Einsatz des EGFR-Inhibitor AG1478 führte zu einem leichten Rückgang der nukleären NFκB-Konzentration. AP-1 wurde durch die drei verwendeten Stimulatoren ebenfalls aktiviert, im Gegensatz zu NFκB war hier jedoch ein deutlicher Rückgang des bindungsfähigem AP-1 im Zellkern nach Inkubation mit dem EGFR-Inhibitor (AG1478) für alle drei Stimulatoren erkennbar (Abb. 26 B).



4.5.3 MAP Kinasen sind für die Induktion von hBD-2 und hBD-3 von Bedeutung

Die Inkubation von OE21-Zellen mit den Inhibitoren der MAP Kinasen Mek (PD98059), p38 (SB203580) und JNK (SP600125) führten jeweils zu einer ca. 70%igen Reduktion der beiden Defensinsignale (Abb. 27). Die Zellen wurden dazu für eine Stunde mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert und anschließend für weitere 24h mit *Candida albicans* und PMZ inkubiert. Das mRNA Expressionsniveau wurde mittels real time RT-PCR bestimmt.



5 Diskussion:

Epithelien sezernieren antimikrobielle Peptide, um das Wachstum der mikrobiellen Flora zu kontrollieren. Zwischen dem Immunsystem und den Mikroorganismen besteht ein natürliches Gleichgewicht, welches übermäßiges Bakterienwachstum verhindert. Veränderungen oder Störungen in dieser Koexistenz z.B. durch Alter, Antibiotika-Behandlungen, Tumorwachstum oder HIV-Erkrankungen können in einem Wachstumsvorteil der Bakterien gegenüber den Abwehrmechanismen der Epithelien resultieren. Auf diese Weise wird die durch die Epithelien aufrecht erhaltene Barrierefunktion durchbrochen und es kommt zu Infektionen durch ansonsten nicht pathogene Mikroorganismen. Die Regulation antimikrobieller Peptide während bakterieller Infektionen, durch *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Escherichia coli*, wurde schon im Detail untersucht (Boughan *et al.*, 2006, Tsutsumi-Ishii & Nagaoka, 2003, Wehkamp *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu wurde die Regulation der antimikrobiellen Peptide nach der Besiedlung durch *Candida albicans* bisher noch nicht näher analysiert. Bei alten oder immunsupprimierten Menschen kommt es vermehrt zu einer Entzündung der Speiseröhre (Ösophagus) durch den Hefepilz *Candida albicans* (Candida-Ösophagitis). Diese Pilzart zeigt eine generelle Präsenz im menschlichen Ösophagus, führt bei gesunden Individuen jedoch zu keiner klinisch manifesten Infektion. Da eine *Candida albicans*-Infektion schwere und lebensbedrohliche Krankheiten wie eine Candida-Sepsis verursachen kann, gewinnt sie zunehmend an klinischer Relevanz und die ihr zu Grunde liegenden Pathomechanismen standen deshalb im Fokus dieser Arbeit.

Bei einer *C. albicans*-Infektion kommt es primär zum Befall der Epithelien. In den ersten Stunden bilden sich Filamente, die zunächst nur die Oberflächen-nahen Schichten penetrieren können. Doch bereits nach ca. 24 h ist das gesamte Gewebe von *C. albicans*-Hyphen durchzogen, wodurch es zu schweren Gewebsschädigungen kommen kann (Bernhardt *et al.*, 2001). Um die Penetration der Epithelien zu erleichtern, verfügen die *C. albicans*-Zellen über Virulenzfaktoren und Moleküle, die die Aktivierung des Immunsystems verhindern oder beenden (Lu *et al.*, 2006). Die Epithelien ihrerseits reagieren auf das Eindringen von *Candida albicans* und anderen Mikroorganismen mit der Infiltration der Epithelien durch PMZ, wie Leukozyten und Monozyten, und der Produktion antimikrobieller Peptide (Schaller *et al.*, 2004, Kiehne *et al.*, 2005).

5.1 Die Defensinexpression ist in Ösophagusepithelzellen nach *Candida albicans*-Infektion erhöht

Um die Infektion des Ösophagusepithels durch *Candida albicans* zu charakterisieren, wurden Ösophagusbiopsien von Patienten mit Soorösophagitis und gesunden Individuen genommen und mittels real time RT-PCR Analysen und immunhistochemischer Verfahren untersucht. Dabei zeigte sich, dass in *Candida albicans*-befallenen Epithelien die Expression der β -Defensine hBD-2 und hBD-3 signifikant erhöht ist (Abb. 5). HBD-2 und hBD-3 sind wichtige Bestandteile der angeborenen Immunität und können auf Grund ihrer chemotaktischen Aktivität PMZ an die Infektionsstelle rekrutieren (Yang *et al.*, 1999). Dadurch stellen sie gleichzeitig ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität dar. Des Weiteren besitzen Defensine antibakterielle und antifungale Aktivität (Harder *et al.*, 1997, Hoover *et al.*, 2003). Ihre bakterizide Wirksamkeit erreichen sie hauptsächlich durch Membrandepolarisierungen und -permeabilisierungen (Zasloff, 2002). Mittels Fluoreszenzfärbungen der *Candida albicans*-Zellwand konnte gezeigt werden, dass hBD-2 die Zellwand der Hefen perforiert und gleichzeitig die metabolische Aktivität verringert (Feng *et al.*, 2005). Andere Arbeitsgruppen kamen dagegen zu dem Ergebnis, dass weniger die Destruktion der Zellwand, sondern vielmehr Energie-abhängige und Salz-sensitive Mechanismen für die antifungalen Effekte der β -Defensine verantwortlich sind (Vylkova *et al.*, 2007). Die genauen Wirkmechanismen müssen jedoch noch näher untersucht werden. Zusätzlich zu den β -Defensinen ist auch das Expressionsniveau der α -Defensine HNP1-3 erhöht (Kiehne *et al.*, 2005). Dies erklärt sich durch die Infiltration von PMZ, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, in die befallenen Epithelien. Diese sezernieren, neben ihrer phagozytischen Aktivität, α -Defensine (Chertov *et al.*, 1996). HBD-1 — bereits in gesundem Gewebe auf höherem Expressionsniveau exprimiert als die anderen Defensine — wird durch *Candida albicans*-Infektion in Ösophagusepithelien nicht weiter induziert (Abb. 5). Daher dient es vermutlich, wie auch schon für andere Epithelien beschrieben, der Kontrolle und Aufrechterhaltung der kommensalischen Mikroflora (O’Neil *et al.*, 1999, Wehkamp *et al.*, 2004). HD5 und HD6 werden in nicht relevanten Mengen exprimiert (Abb. 5).

5.2 *In vitro* Analysen der *Candida albicans*-Infektion

Eine *C. albicans*-Infektion wurde mittels oesophagealer Zellen nachgestellt, um die zu Grunde liegenden Regulationsprozesse der β -Defensine besser analysieren zu können. Dazu wurde die oesophageale Plattenepithel-Karzinom-Zelllinie OE21 verwendet, da sie als

einzigste der getesteten Zelllinien nach Inkubation mit dem Zytokin $\text{TNF}\alpha$ eine reproduzierbare Defensinantwort zeigte (Abb. 9). Die OE21-Zellen wurden mit lebenden *Candida albicans*-Suspensionskulturen auf unterschiedliche Weisen inkubiert. Bei der „direkten“ Stimulationsmethode (Abb. 12 A) wurden die Hefezellen auf die Epithelzellen gegeben, und damit der direkte Zell-Zell-Kontakt simuliert. Bei der „indirekten“ Stimulation befanden sich die *Candida albicans* in Transwell-Einsätzen mit einer Porengröße von $0,4\mu\text{m}$, ohne direkten OE21-Zellkontakt (Abb. 12 B). Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob direkter Zellkontakt für die Induktion der Defensine notwendig ist.

Die Expression von hBD-3 ist sowohl durch die „direkte“, als auch durch die „indirekte“ Stimulationsmethode schwach induziert, wobei der Effekt der „indirekten“ Stimulation etwas deutlicher ist, als der der „direkten“ Stimulation. Die hBD-1- und hBD-2-Expression werden nicht beeinflusst (Abb. 13). Im Zuge der Stimulationsexperimente zeigte sich, dass *C. albicans*-Zellzahlen größer als 10^4 Z/ml das Wachstum der OE21-Zellen unterdrücken. Für Analysen konzentrationsabhängiger Effekte wurden daher Kulturüberstände von *Candida albicans* hergestellt, deren Zellzahlen bei 10^5 bis 10^6 lagen. Die anschließende Inkubation der OE21-Zellen mit diesen Überständen resultierte in einer stärkeren Induktion der hBD-3-Expression, sowie der Induktion von hBD-2 (Abb. 15). Das hBD-1-Expressionsniveau blieb dagegen weiterhin unbeeinflusst. Auch die Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, EGF oder bakteriellen Stimuli (LPS und PGN) beeinflusste die Transkription von hBD-1 nicht (Abb. 9 – 11, Harder *et al.*, 2004, Wehkamp *et al.*, 2004).

Diese Resultate belegen, dass hBD-1 nicht reguliert wird und dass die Induktion der Defensine hBD-2 und hBD-3 konzentrationsabhängig vom Induktor ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Detektion der Infektion auch ohne direkten Zellkontakt mit dem pathogenen Organismus erfolgt. Im Gegensatz dazu berichten anderer Arbeitsgruppen, dass direkter Zellkontakt für die Induktion von β -Defensinen notwendig ist (Steele *et al.*, 2000) und das Hitze-inaktivierte *C. albicans*-Zellen ebenfalls die Expression von hBD-2 induzieren können (Pivarcsi *et al.*, 2005). Auch sind Studien bekannt, die zeigen, dass hBD-1 durch bakterielle oder fungale Stimuli induziert werden kann (Sorensen *et al.*, 2005, Lu *et al.*, 2006). Diese Aussagen konnten in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Im Gegenteil deuten die erzielten Resultate darauf hin, dass lösliche Faktoren für die Induktion verantwortlich sind und lebende *Candida albicans* Zellen die Expression der Defensine hBD-2 und hBD-3 — aber nicht hBD-1 — induzieren. Das etablierte Modell der „indirekten“ Stimulation, ohne den direkten Zellkontakt zu den Epithelzellen, entspricht zudem eher der *in vivo* Situation, da sämtliche Zellen der Epithelschicht Defensine produzieren, wie in Abb. 6 gezeigt ist, und nicht nur solche, die in direktem Kontakt zu den Hefezellen stehen.

5.3 Der Einfluss von PMZ und Zytokinen auf die Defensin-Induktion nach *Candida albicans*-Infektion

Die Infektion von Geweben durch Pathogene wie *Candida albicans* ist durch die Infiltration der betroffenen Epithelien durch Neutrophile und Makrophagen (PMZ) gekennzeichnet. Diese sind in der Lage Pathogene zu phagozytieren bzw. sie durch die Freisetzung von Toxinen (Stickstoffmonooxid), α -Defensinen (HNP 1-3) oder LL-37 abzutöten (Szolnokoy *et al.*, 2001). Um die Infiltration der Epithelien durch PMZ nach *Candida albicans*-Infektion zu simulieren, wurden die ösophagealen Zellen mit Hefezellen und PMZ kostimuliert. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob und welche Effekte die PMZ auf die Defensinexpression haben.

Werden OE21-Zellen mit PMZ unter direktem Zell-Zell-Kontakt inkubiert, führt dies bereits zu einer 6-fachen Steigerung des hBD-2-mRNA-Levels. Die gleichzeitige Inkubation der OE21-Zellen mit *Candida albicans* in einem Transwell-Einsatz führt zu einer synergistischen Induktion des hBD-2-Expressionsniveaus (Abb. 16). Additive Prozesse alleine sind nicht in der Lage diesen Effekt zu erklären. Vielmehr scheinen durch die Kostimulation Mechanismen aktiviert zu werden, die eine besonders starke hBD-2-Expression induzieren.

Die Detektion pathogener Bakterien und Pilze, und die anschließende Infiltration der Epithelien durch PMZ resultiert in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-1 (Schaller *et al.*, 2004). So zeigen auch die in dieser Arbeit untersuchten Ösophagusbiopsien eine deutlich erhöhte Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 nach *C. albicans*-Infektion (Abb. 7, Kiehne *et al.*, 2005). Zytokine und Chemokine sind wichtige Vermittler des Immunsystems und rekrutieren Leukozyten zur Verteidigung des Gewebes an den Infektionsherd. Ihre essentielle Funktion im Verlauf einer Infektion zeigt sich in Untersuchungen an Mausmodellen, bei denen das Fehlen von Neutrophilen (Neutropenie) in einer erhöhten Virulenz der untersuchten *C. albicans*-Stämme resultiert (Molero *et al.*, 2005). Die beobachtete Induktion von hBD-2 in den *in vitro*-Analysen könnte demnach auf Zytokine zurückzuführen sein, die von den PMZ freigesetzt werden. So wurde bereits beschrieben, dass IL-1 der entscheidende Induktor der hBD-2-Expression in Keratinozyten ist. Es wird von den PMZ jedoch erst in signifikanten Mengen produziert, wenn diese mit LPS vorinkubiert werden (Tsutsumi-Ishii & Nagaoka, 2003, Liu *et al.*, 2003). Einhergehend mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das IL-1-mRNA-Niveau von Epithelzellen nach Kontakt mit *Candida albicans* signifikant ansteigt (Abb. 14). IL-1 β wird demnach nicht nur durch PMZ direkt induziert, sondern zusätzlich durch *C. albicans*-Zellen, die dadurch indirekt ebenfalls die IL-1-Expression weiter stimulieren.

Das Expressionsniveau der Zytokine IL-6, IL-8 oder TNF α dagegen, wird *in vitro* durch *Candida albicans* nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). IL-6 und IL-8 sind zudem nicht in der Lage die Expression der hBDs zu induzieren und somit für deren Aktivierung nicht von Bedeutung.

Dagegen sind IL-1 β und TNF α potente Induktoren der hBD-2-Expression in Epithelzellen (Abb. 9 & 10, Harder *et al.* 2004, Moon *et al.*, 2006) und könnten theoretisch für die Induktion der hBD-2-Expression verantwortlich sein. Dazu müssten sie jedoch sezerniert werden, um an extrazellulären Rezeptoren zu binden, die im Anschluss die entsprechenden Signalkaskaden aktivieren. Um festzustellen welche Zytokine von den beteiligten Zellen freigesetzt werden, wurden die Zellkulturmedien nach Abschluß der Inkubation auf ihre Zytokinzusammensetzung mit Hilfe eines Zytokine-Arrays untersucht (Abb. 21).

Die Epithelzellen sezernieren mit und ohne vorherige *C. albicans*-Inkubation Chemokine wie Gro α , MIF oder SerpinE1 (Abb. 21 A und B). In Anwesenheit von PMZ kommt es zusätzlich zur Freisetzung von IL-6 und IL-8 (Abb. 21 C), die jedoch keine signifikante Feedback-Defensinexpression der OE21 bewirken konnten (Abb. 10). Erst die Kostimulation der oesophagealen Zellen mit PMZ und *Candida albicans* resultiert in der Sezernierung von IL-1 α und IL-1 β (Abb. 21 D).

Die Inkubation mit *C. albicans* oder PMZ führt somit zur mRNA-Expression von IL-1 β , jedoch nicht zur Sezernierung aus den Epithelzellen. Die unter diesen Bedingungen womöglich freigesetzten Mengen lagen eventuell unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode und waren deshalb nicht nachweisbar. In jedem Fall führt erst die Koinkubation der Epithelzellen zu der Freisetzung signifikanter Konzentrationen an IL-1 β . Dieses IL-1 β könnte für die synergistische hBD-2-Expression nach *C. albicans*-Infektion verantwortlich sein.

Die hBD-3-mRNA-Expression wird durch die Inkubation mit *Candida albicans* und PMZ ebenfalls synergistisch induziert (Abb. 16). Die Inkubation mit PMZ bewirkt einen 5-fachen Anstieg der hBD-3-mRNA-Expression, während die Kostimulation in einer 10-fachen Induktion resultiert. Eine Beteiligung von Zytokinen an der hBD-3-Expression erscheint unwahrscheinlich, da von den getesteten Zytokinen nur IFN γ in der Lage war diese in der oesophagealen Zelllinie OE21 zu induzieren (Abb. 10). IFN γ ist jedoch im Zellkulturmedium nach Stimulation oder auf mRNA Ebene nicht nachweisbar (Abb. 21, Daten nicht gezeigt). Ein weitaus potenterer Induktor der hBD-3-Expression ist EGF und in geringerem Maße auch TGF α (Abb. 11). Die Stimulation mit EGF führt zu einer hBD-3-Induktion um das 120-fache, wohingegen die Inkubation mit TGF α nur in einem 14-fachen Anstieg resultierte. Durch identische Konzentrationen an IFN γ konnte hingegen nur eine Verdreifachung des Expressionsniveaus erreicht werden. Eine Identifizierung des Liganden soll in Fortsetzung dieser Arbeit erbracht werden.

5.4 Die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 sind an der Defensin-Induktion nach *Candida albicans*-Infektion beteiligt

Analysen belegen, dass die Expression der β -Defensine auf Transkriptionsebene, z.B. über Transkriptionsfaktoren, reguliert wird (Beckloff & Diamond, 2008). Untersuchungen der Promotorregion von hBD-2 und hBD-3 ergaben, dass der hBD-2-Promotor über drei NF κ B- und eine AP-1-Bindestelle verfügt (Wehkamp *et al.*, 2006), während der hBD-3 Promotor mehrere AP-1-Bindestellen besitzt (Jia *et al.*, 2001). Das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer NF κ B-Bindestelle wird kontrovers beschrieben. Ging man bisher davon aus, dass der hBD-3-Promotor keine NF κ B-Bindestelle besitzt (Jia *et al.*, 2003), so wurde kürzlich in einigen Arbeiten eine NF κ B-abhängige hBD-3-Expression beschrieben (Albanesi *et al.*, 2007). Ungeachtet dieser Kontroverse wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und in wie weit beide Transkriptionsfaktoren die Expression der Defensine hBD-2 und hBD-3 kontrollieren. Sowohl NF κ B, als auch AP-1 sind in Abhängigkeit von konservierten Signalkaskaden reguliert. Diese werden von Wachstumsfaktoren, Zelldifferenzierung und Infektionen aktiviert und sitzen „downstream“ von wichtigen Rezeptoren, wie z.B. TLRs, TNFR, IL-1R oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren und ihren Liganden (siehe 1.7.).

Um die Bedeutung der beiden Transkriptionsfaktoren für die Defensin-Induktion zu untersuchen, wurden „Gel-shift“-Analysen durchgeführt. Auf diese Weise konnten die nukleäre Präsenz und die Bindungsfähigkeit der Transkriptionsfaktoren bestimmt werden. Die Analysen der nukleären Proteine nach Inkubation mit *Candida albicans* belegen die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B (Abb. 18). Die maximale Konzentration an DNA-bindungsfähigem NF κ B ist dabei nach einer Stunde Inkubation mit 10^6 *Candida albicans* Z/ml im Zellkern nachweisbar (Abb. 18 A), während die höchste Konzentration an aktiviertem AP-1 erst nach 3 h erreicht wird (Abb. 18 C). In beiden Fällen ist die nukleäre Konzentration des Transkriptionsfaktors von der Konzentration des Stimulus abhängig. So ist im Zellkern nach 3-stündiger Inkubation mit 10^6 *Candida albicans*-Zellen/ml eine deutlich höhere Konzentration an bindungsfähigem AP-1 nachweisbar, als mit 10^4 *Candida albicans*-Zellen/ml (Abb. 18 C & D). Ebenso verhält es sich mit NF κ B (Abb. 18 A & B). Auch die Inkubation mit PMZ resultiert in einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 nach 1 h bzw. 3 h (Abb. 20 B und D). Die zeitlich versetzte Aktivierung der beiden Transkriptionsfaktoren könnte ein Indiz dafür sein, dass sie über unterschiedliche Signalkaskaden reguliert werden, somit von verschiedenen Induktoren aktiviert werden (siehe 1.6).

Der auf mRNA-Ebene beobachtete synergistische Effekt der Defensinexpression nach Kostimulation mit *Candida albicans* und PMZ zeigt sich auch auf der Ebene der

Transkriptionsfaktoren (Abb. 20 A und C). Beide sind nach paralleler Inkubation der Epithelzellen mit *C. albicans* und PMZ deutlich stärker aktiviert, als nach Stimulation mit Hefezellen oder PMZ. Der diesen Synergismus auslösende Faktor, und damit gleichermaßen der Induktor der hBD-2- und hBD-3-Expression, liegt demnach „upstream“ der NF κ B- und AP-1-Aktivierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Translokation beider Transkriptionsfaktoren in den Nukleus durch *C. albicans* bzw. durch Kostimulation mit PMZ im epithelialen Zellkultursystem induziert wird. Ob sowohl NF κ B, als auch AP-1 für die Induktion der einzelnen Defensine notwendig ist, sollte mithilfe von Inhibitionsversuchen analysiert werden.

5.5 Analyse der NF κ B-Relevanz für die Defensin-Induktion

„Supershift“-Experimente dienten der Spezifitätskontrolle der eingesetzten Sonden der „Gel-shift“-Analysen. Gleichzeitig konnte durch sie nachgewiesen werden, dass die entscheidenden Signalkaskaden einen NF κ B-Proteinkomplex, bestehend aus den Untereinheiten p65 (RelA) und p50, und ein c-jun-Homodimer aktivieren (Abb. 19). Der p65/p50-Komplex ist das am häufigsten vorkommende Heterodimer und stellt die am weitesten verbreitete Form des NF κ Bs dar (Gosh *et al.*, 1998). Dieses Dimer ist auch für die hBD-2-Induktion nach LPS-Stimulation in Lungenepithelzellen verantwortlich (Tsumi-Ishii & Nagaoka, 2003). Die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass die Inhibierung der nukleären Translokation des NF κ B (Abb. 23) durch p65-siRNA in einem signifikanten Rückgang der hBD-2 Expression (80%) resultiert (Abb. 24). Die hBD-3-Expression wird durch die p65-siRNA nicht beeinflusst. Die Ursache könnte entweder die fehlende NF κ B-Bindestelle in der Promotorregion sein (siehe oben), oder die fehlende Relevanz dieses Transkriptionsfaktors für die Regulation der hBD-3-Expression. In beiden Fällen ist NF κ B für die Regulation der hBD-3-Expression nicht von Bedeutung.

Für die hBD-2-Expression nach *C. albicans*-Infektionen ist NF κ B dagegen von entscheidender Bedeutung. Eine Inhibition der NF κ B-Aktivierung, beispielsweise durch permanente Bindung des Inhibitors I κ B- α an im Zytoplasma vorliegendes NF κ B, würde nach den vorliegenden Ergebnissen einen nahezu vollständigen Verlust der hBD-2-Produktion bewirken. Dies würde wiederum die Immunantwort entscheidend verändern und könnte fatale Auswirkungen auf den Organismus haben.

5.6 Analyse der Relevanz von EGFR- und AP-1-abhängigen Signalkaskaden

Sowohl EGF als auch $TGF\alpha$ binden und aktivieren den EGF-Rezeptor, welcher im Ösophagusepithel nachweisbar ist (Abb. 8). Der EGF-Rezeptor ist ein wichtiger Aktivator der MAPK-Kaskaden, der $PLC\gamma$ und der PI3K. Diese wiederum sind entscheidende Induktoren des Transkriptionsfaktors AP-1 (siehe 1.6). Um den Einfluss dieses Rezeptors auf die Defensin-Induktion zu analysieren, wurden ein EGFR-neutralisierender Antikörper und der EGFR-Kinaseinhibitor AG1478 eingesetzt. Zusätzlich wurden durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren die MAP Kinase Signalkaskaden p38, JNK und Erk, die PI3K und die $PLC\gamma$ unterbrochen.

Auf mRNA-Ebene reduzieren sowohl der EGFR-Antikörper, als auch der EGFR-Kinaseinhibitor (Abb. 25) und die MAPK-Inhibitoren PD98059 (Mek1), SB203580 (p38) und SP600125 (JNK 1/2) (Abb. 27) das gemessene hBD-3-Signal um 70-80%. Auch die nukleäre Translokation von bindungsfähigem AP-1 konnte durch Einsatz des EGFR-Kinaseinhibitors vollständig reprimiert werden (Abb. 26). Die Daten belegen damit die Regulation des hBD-3-Gens in Abhängigkeit vom EGF-Rezeptor und vom Transkriptionsfaktor AP-1. Und auch die MAP-Kinasen p38, Erk und JNK scheinen an der Regulation beteiligt zu sein. Im Gegensatz dazu sind andere Signalkaskaden, die durch den EGF-Rezeptor aktiviert werden, wie PI3K oder $PLC\gamma$ (Hackel PO *et al.*, 1999), nicht an der Regulation des hBD-3-Gens beteiligt, da ihre Inhibition keine Auswirkungen auf die hBD-3-mRNA-Expression zeigt (Daten nicht gezeigt). In Keratinozyten untersuchten Sorensen und Kollegen die hBD-3-Expression nach Stimulation mit PMZ und bakteriellen Stimuli wie PGN und LPS. Eine EGFR- und AP-1-abhängige-Regulation der hBD-3-Expression konnte auch von ihnen gezeigt werden (Sorensen *et al.*, 2005). Inhibitoruntersuchungen zur hBD-3-Aktivierung nach *H.pylori*-Infektion von Magenzellen belegten ebenfalls eine EGFR-abhängige Regulation. In diesem Fall waren jedoch nur die MAP Kinasen Erk und JNK, nicht jedoch p38, für die hBD-3 Induktion notwendig (Boughan *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu hBD-3 wird die hBD-2 Expression durch die MAPK-Inhibitoren (Abb. 26) und den EGFR-Kinaseinhibitor AG1478 (Abb. 25) zu 80%, durch den EGFR-AK dagegen nur zu 20% inhibiert (Abb. 25). Die Ursache der unterschiedlichen Beeinflussung der hBD-2-Induktion durch die EGFR-Inhibitoren liegt möglicherweise in ihrer Spezifität begründet. Da Signalkaskaden und die beteiligten Moleküle eng vernetzt sind und sich häufig überschneiden, ist es schwierig eine inhibitorische Substanz zu identifizieren, die tatsächlich nur eine einzige Signalkaskade unterbricht oder einen einzelnen Effektor inhibiert. Im Gegensatz dazu arbeiten Antikörper spezifischer. Durch Einsatz eines Antikörpers können Bindungsstellen blockiert werden, oder aktivierende oder inhibierende Substanzen weggefangen werden und es wird so verhindert, dass sie an ihren spezifischen Rezeptoren

binden. Obwohl beide Inhibitoren die Aktivierung des Rezeptors verhindern, indem sie seine Autophosphorylierung unterbinden, stellt der Antikörper vermutlich die spezifischere Variante der Inhibition dar. Die bessere Wirksamkeit des Kinaseinhibitors AG1478 resultiert möglicherweise aus unspezifischen Wechselwirkungen dieses mit anderen Molekülen der beteiligten Signalkaskaden. Indiz für eine mögliche unspezifische Wechselwirkung der Substanz AG1478 liefert beispielsweise Abbildung 26 A. Dort sieht man, dass die nukleäre NF κ B-Konzentration durch den EGFR-Inhibitor leicht verringert wird, obwohl er laut Herstellerangaben keinen Einfluss auf diesen Transkriptionsfaktor haben dürfte. Diese Reduktion der NF κ B-Aktivität könnte für den Rückgang der ermittelten hBD2-mRNA-Expression aus Abbildung 25 verantwortlich sein und die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des neutralisierenden Antikörpers und des Kinaseinhibitors erklären.

In jedem Fall sind die MAP Kinasen p38, JNK und Erk, AP-1 und zu einem gewissen Anteil vermutlich auch der EGF-Rezeptor an der hBD-2-Induktion beteiligt. Weitaus stärker sind aber NF κ B-abhängige Signalkaskaden für die hBD-2-Expression notwendig, wie oben bereits beschrieben wurde.

6 Zusammenfassung

Die epithelialen Abwehrmechanismen regulieren die Besiedlung der Epithelien durch Kommensale und überwachen das Wachstum pathogener Mikroorganismen, wie z.B. des opportunistischen Hefepilzes *Candida albicans* im Ösophagus. In Folge dessen kommt es bei gesunden Individuen selten zu einer übermäßigen Besiedlung des Ösophagusepithels durch *Candida albicans* oder zu einer Infektion (Candida-Ösophagitis). Bei alten Menschen oder immunsupprimierten Patienten entwickelt sich jedoch häufig eine Candida-Ösophagitis, die sich in einer lebensbedrohlichen Candida-Sepsis manifestieren kann. Die humanen β -Defensine sind wichtige Vermittler der epithelialen Abwehr und werden während einer Candida-Ösophagitis in den Epithelzellen signifikant induziert, wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte. Um die Signaltransduktionskaskaden untersuchen zu können, die für die Defensininduktion nach *Candida albicans*-Infektion des Ösophagusepithels verantwortlich sind, wurde ein *in vitro* Modell mittels der oesophagealen Zelllinie OE21 etabliert. Die Analysen ergaben, dass die Inkubation mit lebenden *C. albicans*-Zellen oder *C. albicans*-Überständen zu einer mäßigen Induktion der β -Defensine hBD-2 und hBD-3 führt. HBD-1 wird weiterhin konstant exprimiert und konnte auch in den nachfolgenden Experimenten nicht induziert werden. Die Inkubation mit *Candida albicans* führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1. Die Kostimulation der OE21-Zellen mit *Candida albicans* und polymorphonukleären Zellen (PMZ) wirkt synergistisch auf die hBD-2- und hBD-3-Expression und induziert diese signifikant. Dieser synergistische Effekt führt ebenfalls zu einer verstärkten nukleären Translokation der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1. Mit Inhibitionsversuchen konnten die entscheidenden Signalkaskaden identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass der hBD-2-Promotor in Abhängigkeit von NF κ B und MAPK/AP-1 reguliert wird. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass proinflammatorische Zytokine für die Induktion der hBD-2-mRNA-Transkription von entscheidender Bedeutung sind. Die Expression von hBD-3 erfolgt in Abhängigkeit von dem EGF-Rezeptor und ebenfalls über die MAP Kinasen und den Transkriptionsfaktor AP-1. Diese unterschiedliche Regulation der β -Defensine ermöglicht eine gestaffelte Reaktion der Epithelien auf Mikroorganismen und Infektionen. HBD-1 kontrolliert das Wachstum der Kommensalen im gesunden Organismus, während hBD-2 und hBD-3 bei Infektionen aktiviert werden. Dabei könnte hBD-2 während der initialen Entzündungsphase als Bestandteil der antimikrobiellen Abwehr wirken, während hBD-3 zeitlich versetzt aktiviert wird und bei Reparaturprozessen und der Wundheilungsphase den Schutz der Epithelien übernehmen könnte.

7 Summary

Epithelial barriers protect individuals against pathogen microorganisms and control growth of commensals. Commensals, like *Candida albicans*, are generally present in the orogastrointestinal tract but they do not reach significant numbers nor are of any clinical relevance to a healthy individual. However, in the oesophagus of immune compromised individuals or geriatric people a *Candida* oesophagitis is of frequent occurrence. Human β -defensins are critical components of host defence at mucosal surfaces. Our recently published results showed that hBD-2 and hBD-3 are up-regulated in *Candida* oesophagitis. Therefore the role of several candidate signalling pathways in *Candida albicans* induced β -defensin expression in the oesophageal cell line OE21 were studied and the potential role of polymorphonuclear cells (PMZ) in *Candida* oesophagitis were analysed. Real time RT-PCR analysis showed that in human oesophageal cell cultures *Candida albicans* is a very weak direct inducer of human β -defensin mRNA, but the induction of hBD-2- and hBD-3-mRNA expression is strongly enhanced when OE21 cells were additionally cultured with PMZ. Gel shift analysis revealed that *Candida albicans* activated NF κ B and AP-1 signalling pathways in the oesophageal cell line. EGF receptor inhibition directly reversed the AP-1 activation and hBD-3 induction, indicating that the EGF receptor and the transcription factor AP-1 are crucial for hBD-3 expression. In addition, an intact MAP kinase pathway is necessary for hBD-3 and also for hBD-2 induction. In contrast to hBD-3, hBD-2 activation seems to be more reliable on cytokine induced NF κ B dependent signalling after exposure to *Candida albicans* cells. In oesophageal cell cultures AP-1 dependent pathways are also of importance for hBD-2 induction. HBD-1 expression is not affected by one of the tested stimuli. Its main function is the control of microbiota in the healthy organism, whereas hBD-2 and hBD-3 are not expressed at significant levels. The divergent signalling events regulating hBD-2 and hBD-3 expression suggest temporal functional variation in terms of infections. HBD-2 may contribute to antimicrobial barrier function during inflammatory phase while hBD-3 plays a more important role during repair and wound healing phase of infection.

8 Literaturverzeichnis

- Agerberth B, Gunne H, Oderberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic is cystein-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 195-9.
- Aggarwal BB. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):745-56.
- Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, Scarponi C, De Pità O, Leung DY, Howell MD. 2008. IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol*. 2007 Jul 15;179(2):984-92.
- Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*. Aug;1(2):113-8.
- Baehr PH, McDonald GB. 1994. Esophageal Infections: Risk factors, Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterol* 106: 509-532.
- Beckloff N, Diamond G. 2008. Computational analysis suggests beta-defensins are processed to mature peptides by signal peptidase. *Protein Pept Lett*. 2008;15(5):536-40.
- Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. 1995. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett*. 368(2):331-5.
- Bernhardt J, Herman D, Sheridan M, Calderone R. 2001. Adherence and invasion studies of *Candida albicans* strains, using in vitro models of esophageal candidiasis. *J Infect Dis*. 2001 Nov 1;184(9):1170-5. Epub 2001 Oct 12.
- Bevins CL. 2003. Antimicrobial peptides as effector molecules of mammalian host defense. *Contrib Microbiol*. 2003;10:106-48.
- Boman HG. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 61-92.
- Boman HG. 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173: 5-16.
- Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, Park JH, Ewings KE, *et al.* 2006. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem*. 2006 Apr 28;281(17):11637-48. Epub 2006 Mar 2.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

- Certov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani J, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ. 1996. Identification of Defensin-1, Defensin-2 and CAP/ Azurocidin as T-cell Chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem.* 271 (6): 2935-2940.
- Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):37-40.
- Curran T, Franza BR Jr. 1988. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell.* 1988 Nov 4;55(3):395-7.
- Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G. 2003. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Dec;60(12):2604-21.
- Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur 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(9):3952-6.
- Dimopoulos G, Richman A, Muller HM, Kafatos FC. 1997. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* 4:11508-13.
- Du C, Calderone R, Richert J, Li D. 2005. Deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans* contributes to enhanced killing by human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 2005 Feb;73(2):865-71.
- Dunne A, O'Neill LA. 2003. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense *Sci STKE.* 2003 Feb 25;2003(171):re3.
- Dunsche A, Acil Y, Siebert R, Harder J, Schröder JM, Jepsen S. 2001. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* 30: 154-8.
- Eferl R, Wagner EF. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003 Nov;3(11):859-68.
- Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. 2005. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J Dent Res.* 84(5):445-50.
- Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. 2008. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol.* 2008 Jun 12. [Epub ahead of print]
- Filler SG, Sheppard DC. 2006. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog.* 2006 Dec;2(12):e129.
- Filler SG. 2006. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Aug;9(4):333-9. Epub 2006 Jul 11.
- Gallo RC. 1971. Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* 234: 194-198.

- Ganz T, Lehrer RI. 1994. Defensins. *Curr Opin Immunol* 6: 584-589.
- Ganz T, Lehrer RI. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 10:41-4.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76: 1436-9.
- García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R. 2001. Identification of a novel, multifunctional β -defensin (human β -defensin 3) with specific antimicrobial activity. *Cell Tiss Res* 306: 257-264.
- García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. 2001b. Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* (15)10: 1819-21.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
- Goff JS. 1988. Infectious causes of esophagitis. *Annu Rev Med*. 1988;39:163-9.
- Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Apr;11(2):184-9.
- 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 β -Defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276 (8): 5707-5713.
- Harder J, Mexer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM. 2000. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF α and IL-1 β , but not IL-6 induce human β -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 β -Defensins (hBD-1, -2, -3 and -4) in Keratinocytes is Inhibited by Retinoic Acid. *J Invest Dermatol* 123: 522-529.
- Hellerbrand C, Jobin C, Jimuro Y, Licato L, Sartor RB, Brenner DA. 1998. Inhibition of NFkappaB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor [see comments]. *Hepatology* ;27(5):1285-95.
- Hellmig S, Fölsch UR. 2007. Gastroesophageal reflux: diagnostics and therapy of a widespread disease. *Med Klin (Munich)*. 2007 May 15;102(5):373-80; quiz 381-2.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*. 2004 Dec 1;117(Pt 25):5965-73.

- Hoover DM, Wu Z, Tucker K, Lu W, Lubkowski J. 2003. Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Sep;47(9):2804-9.
- Huttner KM, Bevins CL. 1999. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 45:785-794.
- Janeway CA, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.
- Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, McCray PB Jr. 2001. Discovery of new human β -Defensins using a genomics-based approach. *Genes* 263: 211-218.
- Jones DE, Bevins CL. 1992. Paneth Cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267 (32): 23216-23225.
- Jones DE, Bevins CL. 1993. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS* 315 (2): 187-192.
- Karin M, Greten FR. 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):749-59.
- Kawai T, Akira S. 2006. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007 Feb;19(1):24-32. Epub 2007 Feb 1.
- Kiehne K, Brunke G, Meyer D, Harder J, Herzig KH. 2005. Oesophageal defensin expression during *Candida* infection and reflux disease. *Scand J Gastroentol* 40: 501-507.
- Lehrer RI, Ganz T. 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14: 96-102.
- Lehrer RI, Ganz T. 2002b. Cathelicidins: A family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hepatol* 9:18-22.
- Linzmeier R, Ho CH, Hoang BV, Ganz T. 1999. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* 233:205-11.
- 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.
- Lu Q, Jayatilake JA, Samaranyake LP, Jin L. 2006. Hyphal invasion of *Candida albicans* inhibits the expression of human β -defensins in experimental oral candidiasis. *J Invest Dermatol.* 126; 2049-2056.
- Mahida YR, Rose F, Chan WC. 1997. Antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *Gut* 40: 161-163.
- Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB Jr. 1999. Production of β -Defensin Antimicrobial Peptides by Oral Mucosa and Salivary Glands. *Infect Immun* 67(6): 2740-2745.

- Molero G, Guillén MV, Martínez-Solano L, Gil C, Pla J, Nombela C, Sánchez-Pérez M, Diez-Orejas R. 2005. The importance of the phagocytes' innate response in resolution of the infection induced by a low virulent *Candida albicans* mutant. *Scand J Immunol.* 2005 Sep;62(3):224-33.
- Moon SK, Lee HY, Pan H, Takeshita T, Park R, Cha K, Andalibi A, Lim DJ. 2006. Synergistic effect of interleukin 1 alpha on nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced up-regulation of human beta-defensin 2 in middle ear epithelial cells. *BMC Infect Dis* 6:12,
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Netea MG, van de Veerdonk F, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. 2008. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Jan;52(1):118-23. Epub 2007 Nov 22.
- O'Neil DA, Cole SP, Porter EM, Housley MP, Liu L, Ganz T, Kagnoff MF. 2000. Regulation of human β -defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect Immunol* 68: 5412-5.
- 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.* Dec 15;163(12):6718-24.
- Parkin J, Cohen B. 2001. An Overview of the immun system. *Lancet* 357:1777-89.
- Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabo A, Szell M, Dobozy A, Kemeny L. 2005. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes Infect.* Jul;7(9-10):1117-27.
- Prenzel N., Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. 2001. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification, *Endocrine-Related Cancer*, 8, 11-31, (2001)
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Savage DS. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Microbiol* 31: 107-33.
- Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K. 2005. New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immunol.* Jun;35(6):1886-95.

- Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC. 2004. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. *Microbiology*. 2004 Sep;150(Pt 9):2807-13.
- Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. 2005. Human defensins. *J Mol Med*. Aug;83(8):587-95.
- Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA. 1995. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267:1645-1648.
- Schröder JM. 1999. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 56:32-46.
- Selsted ME, Harwig SS. 1989. Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide. *J Biol Chem* 264: 4003-4007.
- Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002 May;4(5):E131-6.
- Shibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, Tack BF, Vogel HJ. 2002. The solution structures of the human β -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of hBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 277(10): 8279-8289.
- Sørensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N. 2003. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol*. Jun 1;170(11):5583-9.
- Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. 2005. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 174: 4870-4879.
- Steele C, Fidel PL Jr. 2002. Cytokine and Chemokine Production by Human Oral and Vaginal Epithelial Cells in Response to *Candida albicans*. *Infect Immun*. 70(2):577-83.
- Steele C, Leigh J, Swoboda R, Fidel PL Jr. 2000. Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *J Infect Dis*. 2000 Nov;182(5):1479-85. Epub 2000 Oct 9.
- Szolnoky G, Bata-Csörgö Z, Kenderessy AS, Kiss M, Pivarcsi A, Novák Z, Nagy Newman K, Michel G, Ruzicka T, Maródi L, Dobozy A, Kemény L. 2001. A Mannose-Binding Receptor is Expressed on Human Keratinocytes and Mediates Killing of *Candida albicans*. *J Invest Dermatol*. 2001 Aug;117(2):205-13.
- Tang YQ, Selsted ME. 1993. Characterization of the disulfid motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 268: 6649-6653.
- Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, Osaki T. 2003. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med*; 32(10):586-94.

- Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. 2006. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 May;27(5):359-66. Epub 2006 Apr 27.
- 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.
- Tunzi CR, Harper PA, Bar-Oz B, Valore EV, Semple JL, Watson-MacDonell J, Ganz T, Ito S. 2000. Beta-defensin expression in human mammary gland epithelia. *Pediatr Res*. 48(1):30-5.
- Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. 2008. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jun 6. [Epub ahead of print].
- Villar CC, Kashleva H, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. 2005. Invasive phenotype of *Candida albicans* affects the host proinflammatory response to infection. *Infect Immun*. 2005 Aug;73(8):4588-95.
- Vylkova S, Li XS, Berner JC, Edgerton M. 2006. Distinct antifungal mechanisms: beta-defensins require *Candida albicans* Ssa1 protein, while Trk1p mediates activity of cysteine-free cationic peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jan;50(1):324-31.
- Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M. 2007. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan;51(1):154-61. Epub 2006 Oct 30.
- Wang X, Zhang Z, Louboutin JP, Moser C, Weiner DJ, Wilson JM. 2003. Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *FASEB J*. 2003 Sep;17(12):1727-9. Epub 2003 Jul 3.
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, *et al*. 2004. 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*. Oct;72(10):5750-8.
- Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM, Harder J. 2006. *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*. 2006 Jan;126(1):121-7.
- Weindl G, Naglik JR, Kaesler S, Biedermann T, Hube B, Korting HC, Schaller M. 2007. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3664-72.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OMZ, Oppenheim JJ. 1999. Beta- defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286(5439): 525-8.

Zasloff M. 2002. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet*. 2002 Oct 12;360(9340):1116-7.

Zenz R, Wagner EF. 2006. Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(7):1043-9. Epub 2005 Dec 20.

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

Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A. 1999. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Oct;20(10):408-12.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Microliter
µm	micrometer
µg	microgramm
A	Absorption
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Als 1p	agglutinin-like sequence 1 protein
AP-1	Aktivator protein 1 (Transkriptionsfaktor)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua dest.	Destilliertes Wasser
AT	Annealing Temperatur
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	copy-Desoxyribonucleinsäure
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	counts per minute
d	desoxy
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dnase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
EMSA	Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (Gelshiftassay)
Erk	extracellular signal-regulated kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> = und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetal calf serum, fötales Kälberserum
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FITC	fluoresceine-β-isothiocyanate; Fluoreszenzfarbstoff
fo	forward
g	Gramm
h	Stunde
hBD	humanes beta Defensin
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HD	Humanes Defensin
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNP	Humanes neutrophiles peptid
Hwp1	Hyphal wall protein 1
IκB	Inhibitor of NF-κB

IFN γ	Interferon gamma
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
InsR	Insulin Rezeptor
JNK	c-jun N-terminal kinase
k	kilo
KGFR	keratinocyte growth factor receptor
l	Liter
LAB	lingual antimicrobial peptide
LB	lysogeny broth
LC	LightCycler®
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucin-rich-region
M	Molar
M	männlich
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mek	MAP or Erk kinase/mitogen activated protein kinase kinase
MG	Molekulargewicht
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	milli Molar
MP	Messpunkt
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
n	nano
Ng	nanogramm
NF- κ B	Nuclear Factor-kappaB (Transkriptionsfaktor)
nM	nano Molar
NMR	nuclear magnetic resonance
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidinsäure
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	pathogen-associated-molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor
Pen	Penizillin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PLC γ	Phospholipase C gamma
PMA	Phorbolmyristoylacetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PMZ	polymorphonukleäre Zellen
Poly(A)	Polyadenylsäure
PRR	pattern recognition receptors
Rantes	Regulated on activation, normal T expressed and secreted
rev	reverse
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute; Zellkulturmedium
RPTK	Rezeptor-Protein-Tyrosin-kinase
RT	Reverse-Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase

SAPK	stress activated protein kinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sec	Sekunde
SerpinE1	Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)
slgA	soluble immunoglobulin A
Strep	Streptavidin
TAE	Tris-Acetat Puffer
TAP	Tracheal antimicrobial peptide
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TGF α bzw. β	Transforming growth factor alpha bzw. beta
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR 1 bzw. 2	TNF-Rezeptor 1 bzw. 2
u.a.	unter anderem
V	Volt
w	weiblich
Z	Zellen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Symbole des Einbuchstabencodes für Aminosäuren:

A Alanin	G Glycin	M Methionin	S Serin
C Cystein	H Histidin	N Asparagin	T Threonin
D Asparaginsäure	I Isoleucin	P Prolin	V Valin
E Glutaminsäure	K Lysin	Q Glutamin	W Tryptophan
F Phenylalanin	L Leucin	R Arginin	Y Tyrosin

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A Adenin	C Cytosin
G Guanin	T Thymidin

10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. Karlheinz Kiehne für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken. Bei Herrn PD Dr. Alexander Arlt möchte ich mich für seinen persönlichen Einsatz, die hervorragende Betreuung und seine Unterstützung danken, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. T. C. G. Bosch danke ich für sein Interesse und die offizielle Betreuung der Dissertation.

Für die kritische Durchsicht dieser Arbeit, die moralische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit im Labor danke ich ganz besonders Katja Klausz und Gabriele Brunke.

Weiterhin bedanke ich mich bei Cornelia Wilgus, Gunda Seligmann-Dechow und Christiane Sandberg für den Spaß bei der Laborarbeit, ihre Unterstützung und die entspannte Arbeitsatmosphäre.

Silvia Voss aus dem Institut für Infektionsbiologie danke ich für die kompetente Unterstützung bei der Durchführung von Stimulationsexperimenten.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und allen voran bei meinem Mann Thorsten bedanken, die mir die Möglichkeit zum Studium gegeben haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadine Steubesand
Geburtsdatum: 25.07.1978
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Derzeitige Anschrift: Holtenauer Str. 309, 24106 Kiel

Schulbildung

1985-1987 August-Jasper Grundschule, Frankfurt am Main
1987-1989 Selzerbach Grundschule, Karben
1989-2008 Augustinergymnasium, Friedberg, Abschluss: Abitur

Weiterer Bildungsweg

1998-2004 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
Nov. 2002-Mrz. 2003 Biologie-Diplom (Mikrobiologie, Genetik, Biochemie)
Apr. 2003-Dez. 2003 Diplomarbeit bei der Zentaris GmbH, Frankfurt (Dr. I. Seipelt).
Thema: „Etablierung eines Kinasepanels — Zur Selektivitäts-
Testung von potentiellen Kinaseinhibitoren“
seit Aug. 2005 Beginn der Doktorarbeit an der Klinik für Allgemeine Innere
Medizin der CAU (PD Dr. K. Kiehne, offizielle Betreuung durch
Prof. Dr. T. C. G. Bosch). Thema: „ Untersuchungen zur hBD-2-
und hBD-3-Expression und -Regulation während einer Candida-
Ösophagitis“.

12 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 Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Kiel, den

Nadine Steubesand

Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

Steubesand N, Brunke G, Fölsch UR, Herzig KH, Kiehne K (2006): Regulation antimikrobieller Peptide durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Candida-Antigene in Ösophagusepithelien. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 699-941: P033 (Abstract).

Steubesand N, Brunke G, Fölsch UR, Herzig KH, Kiehne K (2006): Regulation of antimicrobial peptide expression by growth factors, cytokines and candida antigens in oesophageal epithelia. *Gut Supplement, Nov: Vol 55: OP-G-215* (Abstract).

Steubesand N, Brunke G, Herzig KH, Fölsch UR, Kiehne K (2007): Lymphozytäre Zytokine und Candida Antigene als synergistische Induktoren bei der Expression antimikrobieller Peptide im Ösophagus. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 686-911: P190 (Abstract).

Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, Herzig KH, Schreiber S, Fölsch UR, Rosenstiel P, Arlt A. The expression of the β -defensins hBD2 and hBD3 is differentially regulated by NF- κ B and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of esophageal candidiasis. Submitted