

Aus dem Physiologischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. M. Bleich)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

DIE WIRKUNG ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE AUF EPITHELZELLEN

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

VEIT MANFRED VAßEN
aus Mönchengladbach

Kiel 2010

1. Berichtstatter:	Prof. Dr. med. M. Bleich
2. Berichtstatter:	Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder
Tag der mündlichen Prüfung:	20.01.2010
zum Druck genehmigt, Kiel, den	20.01.2010
gez.	Prof. Dr. med. R. Förster-Holst

Meinen Eltern
und den Menschen, die mich
unterstützen

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Antimikrobielle Peptide.....	8
1.1.1	Humane Defensine	10
1.2	Epithelfunktion.....	11
1.2.1	Chloridsekretion und Natriumresorption im Colon	11
1.2.2	Chloridsekretion und Natriumresorption im respiratorischen Epithel	14
1.2.3	Ca ²⁺ abhängige Chloridsekretion am Modell der HT-29 Zelle.....	16
1.3	Fragestellungen dieser Arbeit.....	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Antimikrobielle Peptide.....	18
2.2	Ussingkammer	18
2.2.1	Epitheliale Chloridsekretion.....	20
2.2.2	Epitheliale Natriumresorption	22
2.3	Patch-Clamp	24
2.3.1	Patch-Clamp Methode.....	24
2.3.2	Elektrisches Schaltbild der Zelle.....	25
2.3.3	Messplatz und Geräte	26
2.3.4	Asymmetriepotenziale.....	28
2.3.5	Ganzzelleableitungen an HT-29 Zellen	29
2.4	Fluoreszenzmessung	31
2.4.1	Messung von [Ca ²⁺] _i mittels Fura-2.....	31
2.4.2	20-Minuten-Inkubationsprotokoll	33
2.4.3	24-Stunden-Inkubationsprotokoll.....	34

2.5	hBD-2-ELISA	34
2.6	Kultivierung eukaryotischer Zellen	35
2.6.1	HT-29 Zelllinie (ATCC® Number HTB-38).....	35
2.6.2	Subkultivierung der HT-29 Zellen	35
2.6.3	Inkubation der HT-29 Zellen mit hBD-2 für 24h.....	36
2.7	Lösungen und Substanzen.....	37
2.8	Auswertung und Statistik.....	38
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Einfluss von hBD-2 auf den elektrogenen Elektrolytransport	39
3.1.1	Colon.....	39
3.1.2	Trachea.....	42
3.2	Überprüfung von Porenbildung in der Zellmembran an HT-29 Zellen	44
3.3	Wirkung von AMPs auf die Ca²⁺ Signaltransduktion (akut)	46
3.4	Wirkung von AMPs auf die Ca²⁺ Signaltransduktion (chronisch)	48
3.5	Wirkung von AMPs auf den Ionenleitwert (chronisch).....	50
3.6	hBD-2 Messung im Nährmedium von HT-29 Zellen.....	52
3.7	hBD-2 Verdünnungsreihe in McCoy-Nährmedium	53
4	DISKUSSION.....	54
4.1	Stand der Forschung.....	54
4.2	Wirkkonzentration und Speziesunterschiede	54
4.3	hBD-2 erhöht die cholinerge Antwort im Colonepithel	55

4.4	hBD-2 beeinflusst den elektrogenen Ionentransport im respiratorischen Epithel	56
4.5	hBD-2 führt in HT-29 Zellen nicht zur Porenbildung	56
4.6	hBD-2 erhöht die cholinerge Ca²⁺ Antwort in HT-29 Zellen nach 20min Vorinkubation.....	57
4.7	Langzeiteffekt von hBD-2 auf HT-29 Zellen	58
4.8	Wirkkonzentration von hBD-2	59
4.9	Ausblick und Schlussfolgerungen.....	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	61
7	ANHANG	66
7.1	Danksagung	66
7.2	Lebenslauf.....	67
7.3	Veröffentlichung.....	69
7.4	Erklärung.....	69

1 Einleitung

1.1 Antimikrobielle Peptide

Im Laufe der Evolution haben mehrzellige Organismen einschließlich Pflanzen, Insekten, Amphibien und Säuger verschiedene Strategien gegen potenzielle Pathogene entwickelt. Im Gegensatz zur erworbenen Immunität, die in höheren eukaryoten Lebewesen vorkommt, ist die angeborene Immunität in den meisten Wirtsorganismen der primäre Abwehrmechanismus (1;2). Es ist nicht überraschend, dass sich die ersten Abwehrlinien bei Wirbeltieren im Bereich der inneren und äußeren Grenzflächen des Körpers, d.h. der Haut, der Schleimhäute des Atmungs- und Verdauungstraktes und der Epithelien des Urogenitaltraktes befinden. Man hat inzwischen erkannt, dass die Epithelzellen, die in direktem Kontakt mit den pathogenen Mikroorganismen stehen, nicht nur eine physikalische Barriere gegen partielle Eindringlinge darstellen, sondern auch eine Reihe von chemischen Abwehrstoffen produzieren, die z.B. antibakteriell wirken (3). Die große Vielfalt dieser Wirkstoffe erstreckt sich von anorganischen Molekülen über Lipide bis hin zu Hunderten von Peptiden, die den Großteil der bisher identifizierten und endogen produzierten Abwehrstoffe ausmachen.

Seit J.G. Hirsch vor 50 Jahren „Phagocytin“ als eine Proteinfraction mit antimikrobieller Wirksamkeit aus polymorphkernigen Leukozyten isolierte (4), wurden mehr als 800 antimikrobielle Peptide (AMPs) aus Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten gereinigt und analysiert (3;5;6). Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass die AMPs als chemische Abwehrstoffe für einen nicht unerheblich Teil der Immunabwehr verantwortlich sind. AMPs sind eine heterogene Familie von kleinen Polypeptiden (<100AS), die sich entsprechend ihrer Aminosäurezusammensetzung, Faltung, Ausbildung von Schwefelbrücken und Ladung in verschiedene Untergruppen einteilen lassen (5).

Es gibt gewebespezifische, aber auch ubiquitär exprimierte AMPs. In höheren Wirbeltieren sind an der Sekretion der AMPs hauptsächlich Epithelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen beteiligt (7;8). Die Bakterienflora des Verdauungstraktes wird z.B. durch eine individuelle- und organspezifische Mischung aus Peptiden kontrolliert und gesteuert. Dabei werden die Peptide entweder konstitutiv sezerniert oder durch Bestandteile von Pathogenen wie z.B. LPS (Lipopolysaccharide) induziert (7;9-12). Sie haben spezifisch breite Wirkspektren gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Viren bis hin zu Pilzen und Parasiten. Dies macht sie als potenzielle therapeutische Alternative in Zeiten multiresistenter Krankenhauskeime besonders interessant. Aufgrund ihrer protektiven

Eigenschaften und der scheinbar nicht vorhandenen Resistenzentwicklung von Seiten des Pathogens gehören die AMPs entwicklungsbiologisch zu sehr alten, konservierten Peptiden mit großen Homologien zwischen den Spezies. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht für alle Peptide geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Ein, für einige AMPs ausführlich beschriebener Mechanismus, ist die Schädigung der Bakterienzelle durch Porenbildung in der Zellwand mit anschließender Lyse (13). Zusätzlich wirken AMPs wiederum auch auf die Zellen des Wirtes und beeinflussen deren physiologische Funktion,

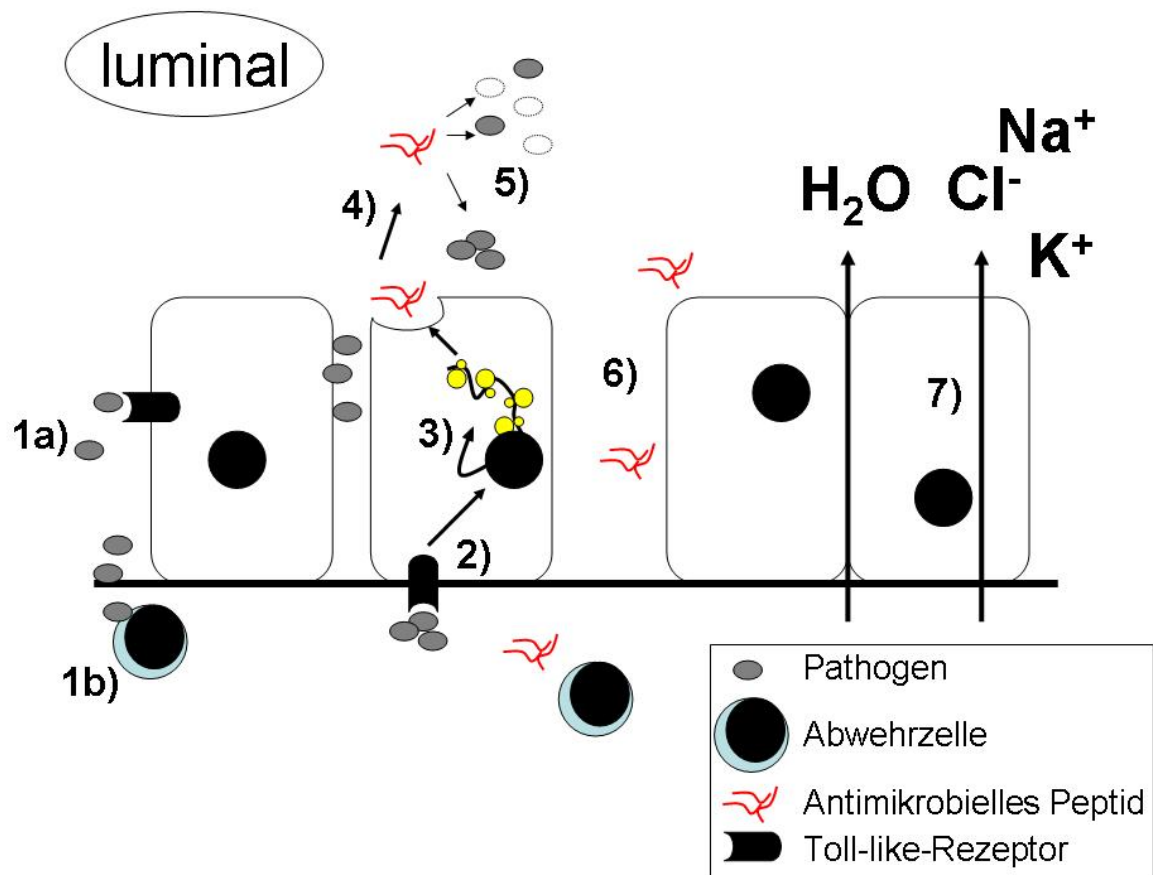


Abbildung 1:

Antimikrobielle Peptide und Epithelzellen

- 1a/b: Pathogene oder deren Bestandteile werden von Epithelzellen (1a) oder von Abwehrzellen (1b) erkannt.
- 2: Rezeptorvermittelte Signaltransduktion führt zur Synthese (3)/Freisetzung (4) von AMPs.
- 5: AMPs beeinträchtigen das Überleben und die Vermehrung der Pathogene z.B. durch Porenbildung.
- 6: AMP wirken zurück auf die Epithel- und Abwehrzellen.
- 7: Epithel- und Abwehrzellen ändern ihren Funktionszustand z.B. Sekretion von Flüssigkeit.

indem sie z.B. zur Freisetzung von Mediatoren führen. Sie dienen hier unter anderem auch als Brücke zur erworbenen Immunität (14-16). Das porenbildende AMP Cryptdin 3 führt z.B. zur Freisetzung von Interleukin 8 (IL-8) in kultivierten humanen intestinalen Epithelzellen und damit zu einer Entzündungsreaktion des Wirtsgewebes (17). Aus der Eigenschaft mancher Peptide, mit Membranen unter Porenbildung zu interagieren, ergibt sich jedoch auch ein potenzielles Problem für den Wirtsorganismus: Abhängig von ihrer Konzentration könnten diese AMPs dann auch die Wirtszellen beeinträchtigen. In der Tat wurde gezeigt, dass Defensine in entsprechender Konzentration verschiedene pro- und eukaryote Zellen durch die Bildung von Poren schädigen können (18). Offensichtlich spielt auch bei diesen körpereigenen Antibiotika die Balance zwischen antimikrobieller Wirkung und wirtsschädigender Nebenwirkung eine wichtige Rolle. Darüber hinaus könnte eine Wirkung von AMPs auf den betroffenen Epithelverband aus folgenden Gründen sinnvoll sein (s. Abb.1):

1. Rückkopplung und Regulation der AMP-Freisetzung
2. Kontrolle der luminalen Salz- und Wasserkonzentration zur Milieukontrolle und Optimierung der Wirkung von AMPs

1.1.1 Humane Defensine

Eine prominente Klasse antimikrobieller Peptide in Säugetieren sind die Defensine. Dabei handelt es sich um eine Gruppe kleiner, kationischer, arginin- und lysinreicher Peptide mit sechs charakteristischen, Disulfidbrücken-bildenden Cysteinresten. Je nach Anordnung dieser Disulfidbrücken werden sie in α -, β - und θ -Defensine eingeteilt (19;20). Defensine werden normalerweise als größere Vorläuferpeptide exprimiert, die sekundär in ihre reife und bakterizide Form gespalten werden (s. auch Abb. 25).

Die α -Defensine HD-5 und HD-6 (HD: *engl. „human defensin“*) wurden in Paneth-Zellen des Dünndarms gefunden und werden zusätzlich von Zellen des Immunsystems exprimiert (21). Die humanen β -Defensine (hBD) werden vor allem von verschiedenen Epithelien produziert. Während hBD-1 konstitutiv exprimiert wird, lassen sich hBD-2 und hBD-3 durch verschiedene Zytokine und durch Kontakt mit Bakterien induzieren (9;22-24). Das humane β -Defensin-2 (hBD-2) wurde 1997 aus Psoriasissschuppen isoliert und war das erste humane β -Defensin, für das sich eine Induzierbarkeit durch Gram-negative Bakterien zeigen ließ (25). Es ist in der sezernierten Form ca. 4kD groß. Sein antimikrobielles Wirkspektrum richtet sich im Wesentlichen gegen Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Pseudomonas* Spezies und verschiedene Hefen, beispielsweise *Candida albicans*, aber auch gegen

Mycobacterium tuberculosis. Die Konzentration, die 90% der untersuchten Bakterien tötet (LD90: engl. „lethal dose for 90%“), beträgt für *Pseudomonas aeruginosa* 10µg/ml und für *Candida albicans* 25µg/ml. Nur bakteriostatisch und weniger effektiv ist die Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*, dessen Wachstum ab einer hBD-2 Konzentration von mehr als 100µg/ml gehemmt wird (24). Wie bei den meisten β-Defensinen sinkt die antimikrobielle Wirkung durch steigende Salzkonzentrationen (26-28).

Aus der Gruppe der humanen Defensine waren sowohl konstitutive und als auch induzierbare AMPs für Experimente verfügbar. hBD-2 wird von Keratinozyten (Hautepithelien), respiratorischem Epithel und Colonepithel auf einen Zytokin- oder bakteriellen Stimulus hin sezerniert (24;26). hBD-1 dagegen wird konstitutiv im Gastrointestinaltrakt exprimiert (29;30).

Die Untersuchung eines möglichen Rückkoppelungsmechanismus auf Epithelzellen könnte einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung der therapeutischen Eignung dieser Peptide leisten.

1.2 Epithelfunktion

1.2.1 Chloridsekretion und Natriumresorption im Colon

Die Aufgaben des Colonepithels bestehen in der Einstellung der Stuhlkonsistenz und des fäkalen Salz- und Wassergehaltes. Die Transportmechanismen des Colons können krankheitsbedingt zu einer verstärkten Sekretion oder zur vermehrten Eindickung des Stuhls führen mit Durchfall oder Verstopfung als Konsequenz (31). Gleichzeitig bestimmt die Sekretion von Salz und Wasser bzw. die Salzkonzentration im Darmlumen die Wirkstärke antimikrobieller Peptide. Damit beeinflusst der Sekretionszustand des Colonepithels direkt und indirekt die Überlebensbedingungen der Pathogene im Darmlumen (32). Prinzipiell sind im Bereich der Colonekrypte zwei parallel ablaufende Ionen-Transport-Vorgänge zu finden: An der Kryptenbasis vornehmlich Cl⁻ Sekretion, an der Oberfläche Na⁺ Resorption (33).

Zunächst zur Chloridsekretion (34):

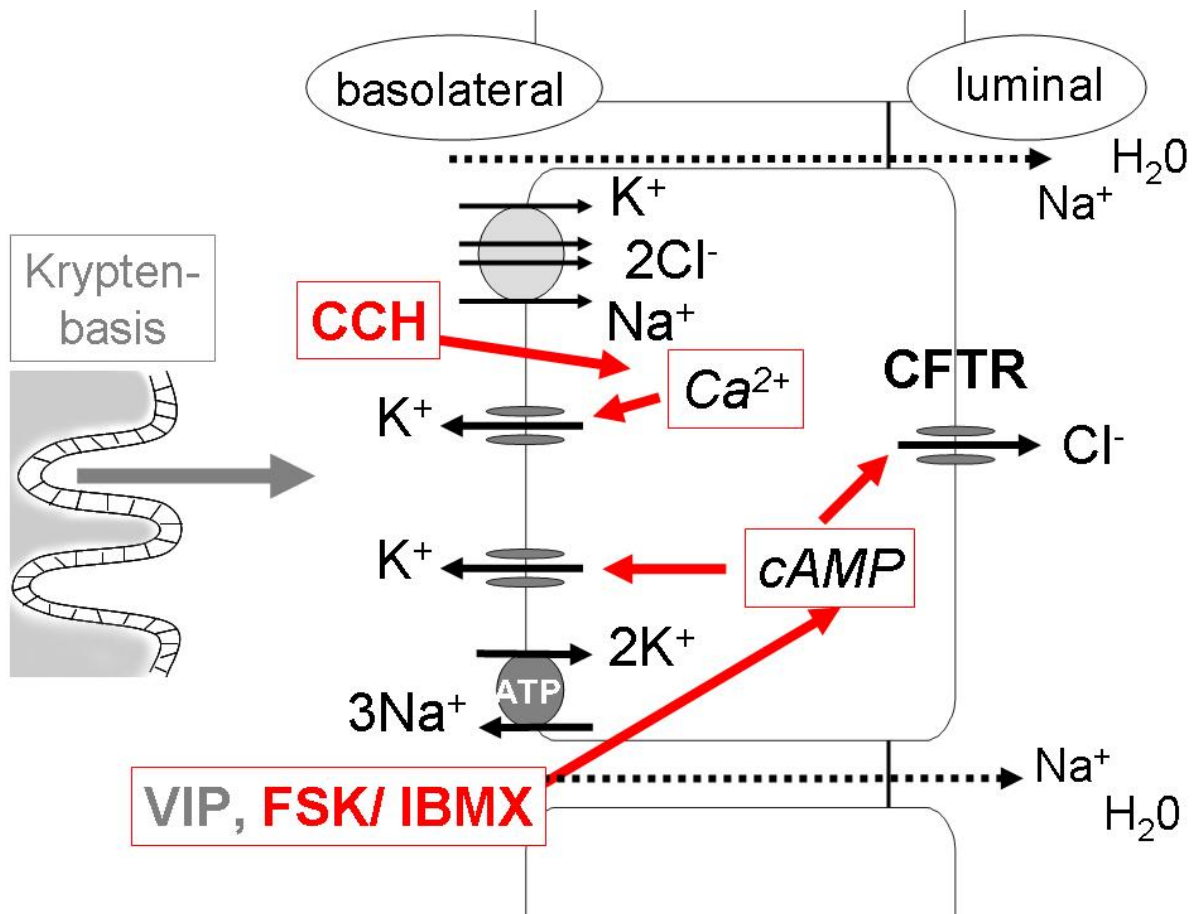


Abbildung 2a:

Mechanismus der Chloridsekretion in der Kryptenbasis des Colons.

Die intrazellulären Botenstoffe Ca^{2+} und cAMP aktivieren basolaterale K^+ und luminale Cl^- Kanäle.

Die basolaterale Cl^- Aufnahme erfolgt über den Na^+ , K^+ , Cl^- -gekoppelten Cotransporter.

Abb. 2a gibt in vereinfachter schematischer Form die beteiligten Mechanismen und deren pharmakologische Beeinflussbarkeit wieder. Alle Epithelzellen der Colorkrypte sind basolateral mit Na^+/K^+ -ATPasen ausgestattet, die einen elektrochemischen Gradienten für diese beiden Ionen über die Zellmembran erzeugen. Die Zellen der Kryptenbasis nutzen diesen Gradienten zur sekundär aktiven Aufnahme von Na^+ , K^+ und Cl^- über den $\text{Na}^+-2\text{Cl}^--\text{K}^+$ -Cotransporter (NKCC1). Zusätzlich existieren basolaterale Kaliumkanäle (KCNN4, KCNQ1/E3), die einen elektrischen Gradienten für die Chloridsekretion aufbauen. Nach Überschreitung des elektrochemischen Gleichgewichtes für Chlorid zu negativen Potenzialen verlässt Cl^- die Enterozyten der Kryptenbasis über luminale Chloridkanäle (CFTR: engl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). Die Regulation von CFTR und KCNQ1/E3 erfolgt über den cAMP vermittelten Weg, der zum Beispiel vom vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) mittels gleichnamigen Rezeptor (VIPR) aktiviert wird. Die cAMP Produktion kann ebenfalls durch das Pharmakon Forskolin (FSK) stimuliert werden.

Zusätzlich kann der Abbau von cAMP durch Isobutylmethylxanthin (IBMX), einem Inhibitor der Phosphodiesterase gehemmt werden. Carbachol (CCH) wirkt agonistisch über muskarinerge M3 Rezeptoren und führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Über die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ -Aktivität werden weitere basolaterale K^+ Kanäle (KCNN4) aktiviert.

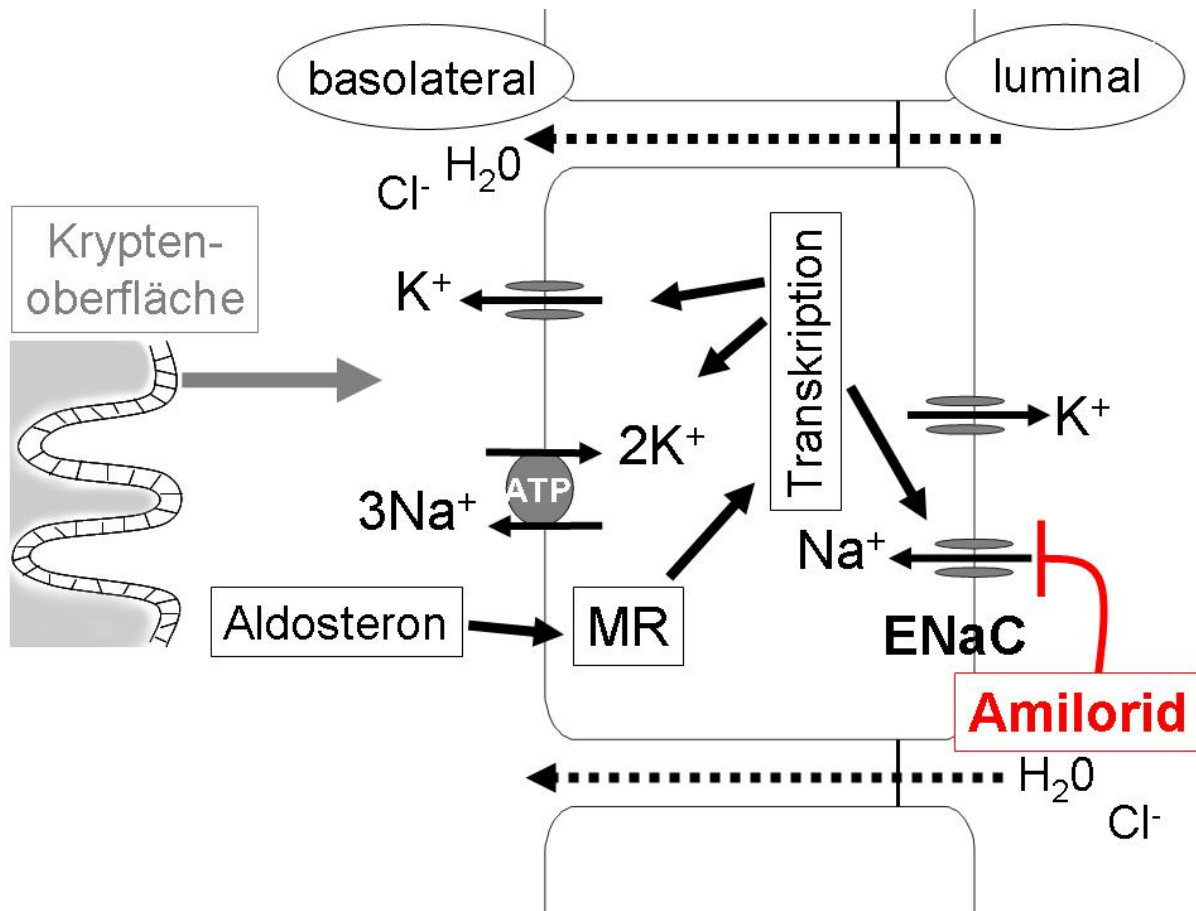


Abbildung 2b:

Mechanismus der Natriumresorption in der Kryptenoberfläche des Colons;
Amilorid hemmt den epithelialen Na⁺ Kanal ENaC.

An der Kryptenoberfläche findet hauptsächlich die Resorption von Na⁺ statt (s. Abb. 2b). Der elektrogene Natriumtransport erfolgt über luminal lokalisierte epitheliale Natriumkanäle (ENaC). Die Triebkraft liefern K⁺ Kanäle (KCNQ1/E3) (31).

ENaCs bestehen aus drei Untereinheiten ($\alpha\beta\gamma$) und sind amiloridhemmbare, für Na⁺ hochselektive Kanäle (35). Die Steuerung der Na⁺ Resorption erfolgt hauptsächlich transkriptionell unter der Kontrolle von Aldosteron über den Mineralocorticoidrezeptor (MR). Beide Systeme, Resorption und Absorption, sind gekoppelt und unterliegen strenger hormoneller Kontrolle, um den ständig wechselnden Gegebenheiten angepasst zu werden

(31). In unseren Versuchen zu hBD-2 haben wir uns im Colon auf die Chloridsekretion beschränkt. Als Modelgewebe benutzten wir distales Rattencolon, dessen Untersuchung und Charakterisierung mit der Ussing-Kammer-Methode in unserem Labor gut etabliert ist.

1.2.2 Chloridsekretion und Natriumresorption im respiratorischen Epithel

Das respiratorische Epithel der Trachea ist im Vergleich zum Colonepithel komplexer aufgebaut, bedient sich aber ähnlicher Mechanismen für den Transport von NaCl und Wasser. Die Resorption von NaCl und Wasser findet in den zilientragenden Zellen der Epitheloberfläche statt, während die Sekretion von NaCl, Wasser und Mukus in den submukösen Drüsen lokalisiert ist. Das Zusammenspiel von Sekretion und Resorption sorgt für die richtige Viskosität und Schichtdicke der Oberflächenflüssigkeit, die zusammen mit der darauf schwimmenden Schleimschicht eine wichtige Schutzbarriere bildet. Die Prinzipien der

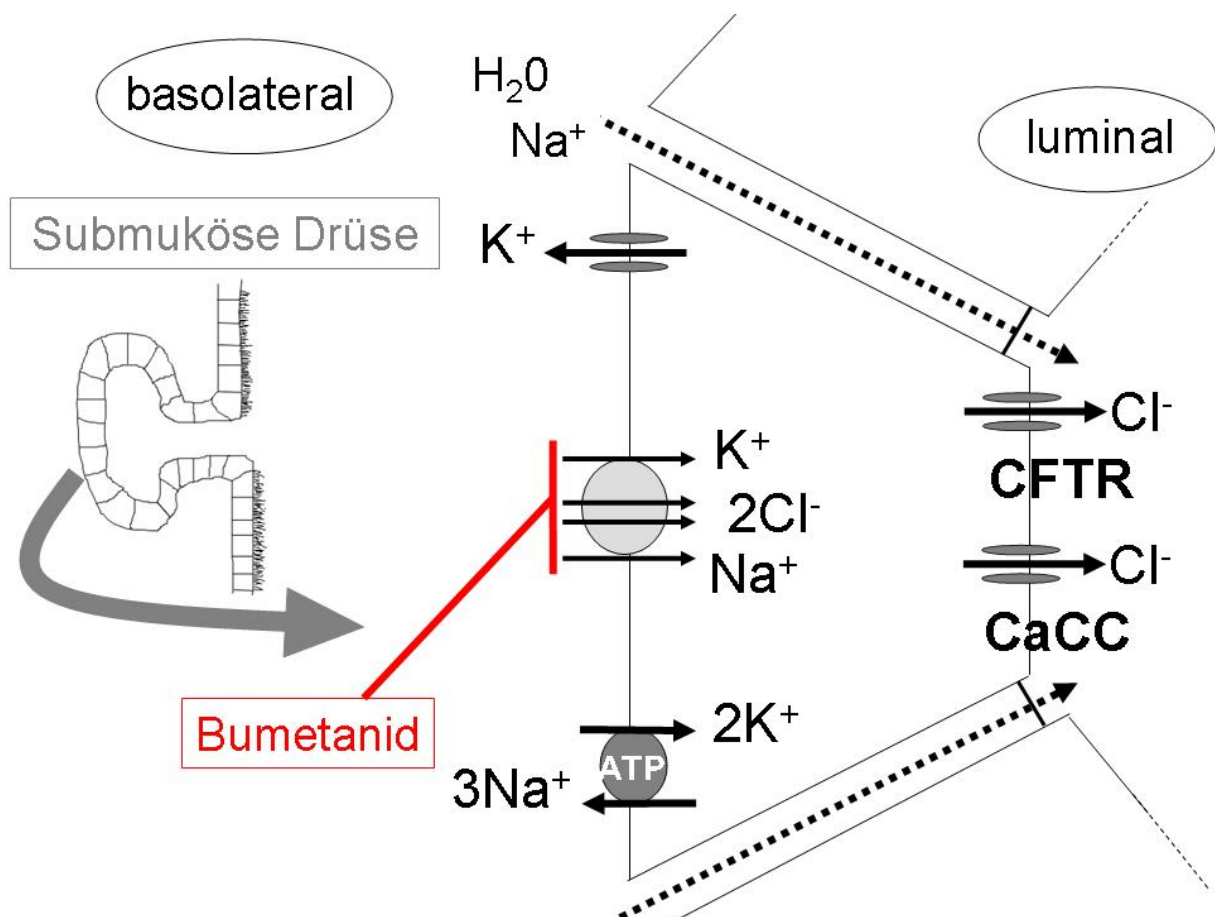


Abbildung 3a:

Chloridsekretion der Submucösen Drüse des respiratorischen Epithels

Bumetanid blockiert den Na⁺/2Cl⁻/K⁺-Cotransporter.

Chloridsekretion und Natriumresorption sind dabei in Vielem vergleichbar zu den Vorgängen im Colon (s. 1.2.1). Wie im Colon erfolgt die Cl^- Aufnahme über den NKCC1 (s. Abb. 3a, submuköse Drüse). Die Triebkraft für die luminale Cl^- Sekretion wird durch das Membranpotenzial gestellt, welches durch die basolateralen K^+ Kanäle erzeugt wird (36). Luminal sind zwei verschiedene Cl^- Kanäle für den Cl^- Ausstrom verantwortlich, zum einen CFTR und zum anderen der durch intrazelluläre Ca^{2+} Erhöhung aktivierbare CaCC. Über die Zellmembran werden die Gradienten für Na^+ und K^+ kontinuierlich über die Na^+/K^+ -ATPasen aufrechterhalten (37). Das Pharmakon Bumetanid blockiert die elektroneutrale Aufnahme von Chlorid, zusammen mit Natrium und Kalium über den NKCC1.

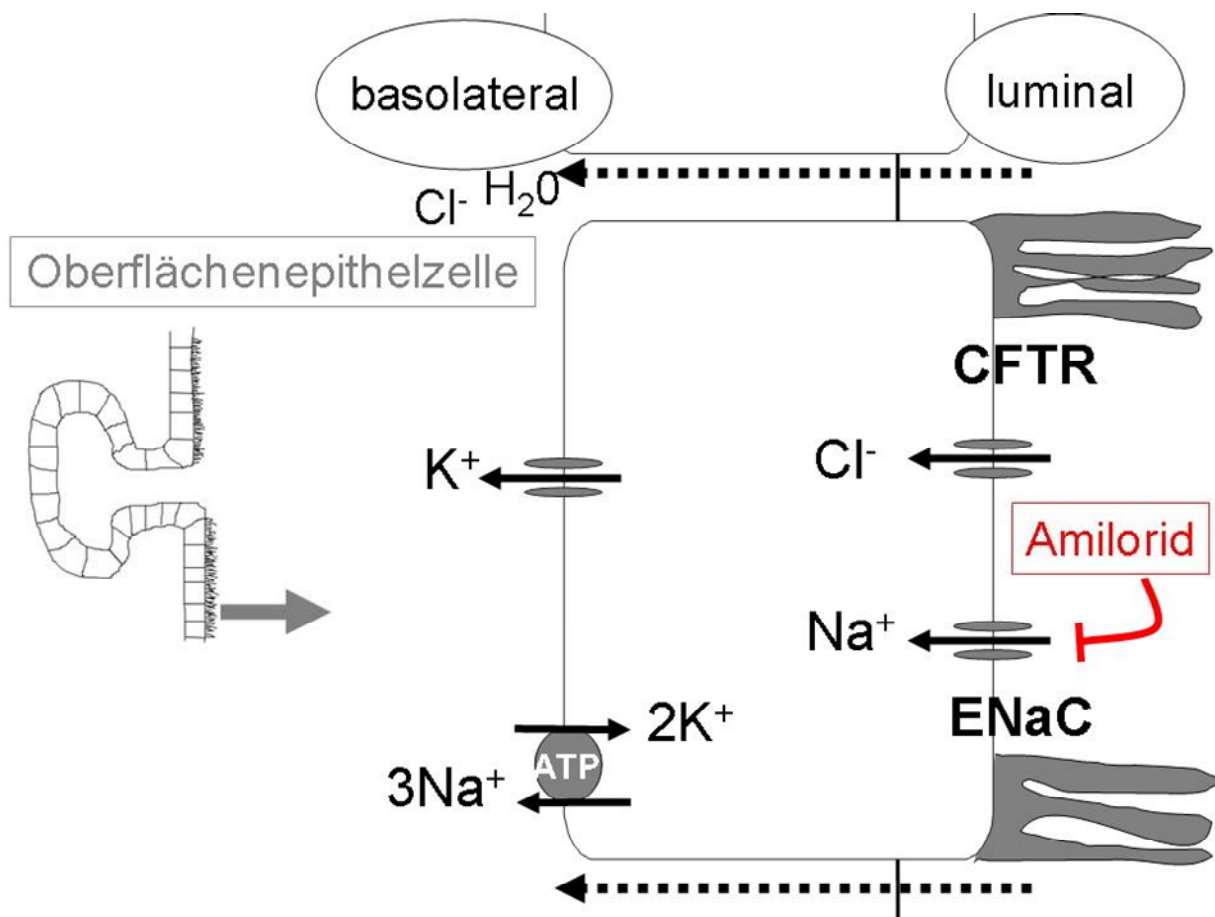


Abbildung 3b:

Natriumresorption der Oberflächenzellen des respiratorischen Epithels

Amilorid blockiert den elektrogenen Na^+ -Kanal ENaC.

Die Na^+ Resorption findet vornehmlich im Oberflächenepithel statt. Gleichzeitig wird der Schleim von diesen Zellen mit Schlägen der Zilien oralwärts bewegt. Auch in den Oberflächenepithelien erzeugen basolaterale Na^+/K^+ -ATPasen einen Gradienten für Na^+ und K^+ . K^+ verlässt die Zellen über basolaterale K^+ Kanäle und liefert so die Triebkräfte für die luminale Na^+ Resorption über ENaC Kanäle (s. Abb. 3b.). ENaCs werden durch Amilorid

gehemmt (s. 1.2.1). Zusätzlich spielt in diesen Zellen CFTR und die luminal Chloridkonzentration eine wichtige Rolle bei der Regulation von ENaC. Ist CFTR als Regulator des Na^+ Kanals defekt, wird verstärkt Na^+ und Wasser resorbiert und der Flüssigkeitsfilm wird zäh. Die mukoziliäre Clearance sinkt und ein hochvisköses eiweißreiches Sekret der mukösen Drüsen führt zur Obstruktion der Atemwege beim Krankheitsbild der Zystischen Fibrose.

Die Maus-Trachea zeigt im Gegensatz zum Ratten-Colon in den Ussingkammer-Experimenten einen langzeitstabilen, amiloridhemmbaren Natriumtransport, so dass wir dieses Epithelmodell für unsere Untersuchung der hBD-2 Wirkung auf Epithelien nutzen.

1.2.3 Ca^{2+} abhängige Chloridsekretion am Modell der HT-29 Zelle

HT-29 Zellen sind ausführlich charakterisierte humane immortalisierte Colonicarcinomzellen und wurden 1964 aus einem Colonadenocarcinom isoliert (38). Die Krebszelllinie zeigt entsprechend ihrer Dedifferenzierung und Herkunft nur noch residuale Eigenschaften einer basalen Colonicryptenzelle. Sie zeichnet sich durch einen ausgeprägten Ca^{2+} regulierten Cl^- Leitwert aus und ist durch zwei typische Ca^{2+} Agonisten wie CCH und ATP stimulierbar (39). Die Agonisten binden an G-Protein-gekoppelte purinerge (P2Y2) und muskarinerge (M3) Rezeptoren. Beide Rezeptoren führen mittels der G-Protein-gekoppelten Signalkaskade zu einer Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Ca^{2+} Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und durch eine zusätzliche Öffnung von SOC's, speicheraktivierbaren Ca^{2+} Kanälen (SOC: *engl. „store operated calcium channel“*) (29). Zur Normalisierung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tragen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher und Ca^{2+} ATPasen in der Plasmamembran (PMCA) sowie am endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien (SERCA) bei.

HT-29 Zellen dienen uns als einfache Modellzellen für Ca^{2+} Signaltransduktion in Colonicrypten (s. Abb. 4).

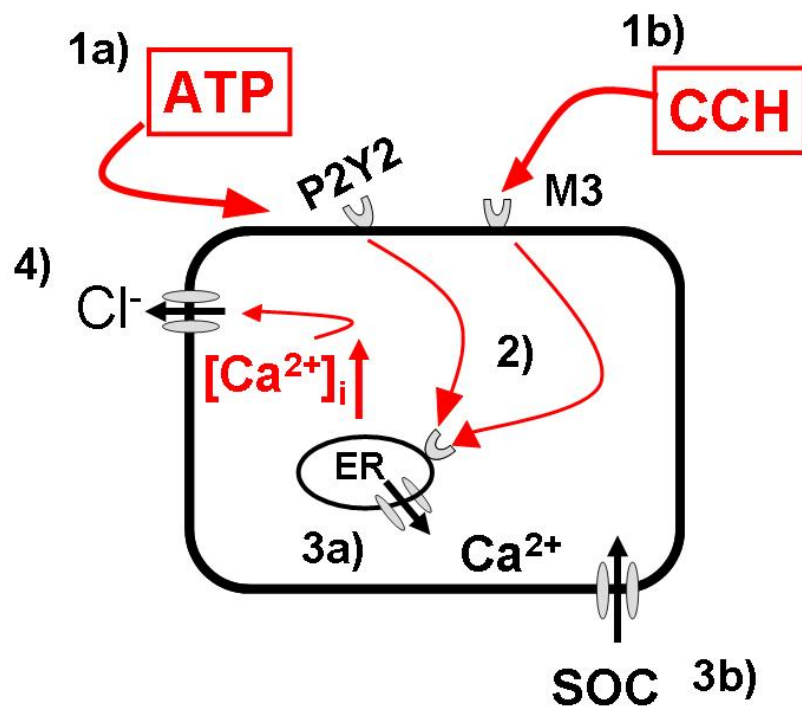


Abbildung 4:

Modell der Ca²⁺ Aktivierung von Chloridkanälen der humanen Colonicarcinomzelle HT-29

1a/b: ATP (1a) und CCH (1b) stimulieren Rezeptoren.

2: G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion aktiviert Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER).

3a/b: Die anschließende Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER (3a) führt zur Öffnung der SOCs (SOC: engl. „store operated calcium channel“) (3b).

4: Ca²⁺ regulierte Chlorid-Kanäle werden aktiviert.

1.3 Fragestellungen dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von AMPs auf Epithelzellen untersucht werden. Für mich ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Können AMPs die Epithelfunktionen steuern oder beeinflussen?
- 2) Besitzen AMPs porenbildende Eigenschaften in HT-29 Epithelzellen?
- 3) Können AMPs die Signaltransduktion zur Steuerung der Elektrolytsekretion beeinflussen?
- 4) Ist der Angriffspunkt der antimikrobiellen Wirkstoffe am Transportprotein selbst oder wird ein klassischer Signaltransduktionsweg genutzt?

2 Material und Methoden

2.1 Antimikrobielle Peptide

Die Defensine hBD-2 und hBD-3 wurden rekombinant aus *E.coli* gewonnen (40) und freundlicherweise von PD Dr. Harder (Klinik für Dermatologie, Kiel) zur Verfügung gestellt. hBD-1 und HD-5 wurde von der Firma PeptaNova (Sandhausen, Deutschland) bezogen. Die Defensine lagen lyophilisiert vor. Defensinmengen von 40-250 μ g wurden mit sterilfiltrierter 0,1% Essigsäure zu 10 μ g/1 μ l (2,5 μ mol/l) oder 1 μ g/1 μ l (0,25 μ mol/l) aufgelöst, in kleinen, auf jeweils für einen Versuch abgestimmten Mengen aliquotiert und in sterile 1,5ml Reaktionsgefäße bei -80°C eingefroren. Als Vehikel-Kontrolle diente die entsprechende Menge 0,1% Essigsäure ohne Peptide.

2.2 Ussingkammer

Elektrogener Ionentransport zwischen luminaler und basolateraler Epithelseite eines Gewebepreparates kann mit der Ussingkammertechnik gemessen werden (41).

Die in der vorliegenden Arbeit genutzte modifizierte Ussingkammer besteht aus zwei getrennt kontinuierlich perfundierbaren Halbkammern und ermöglicht die elektrische Isolation zwischen luminaler und basolateraler Epithelseite (s. Abb. 5).

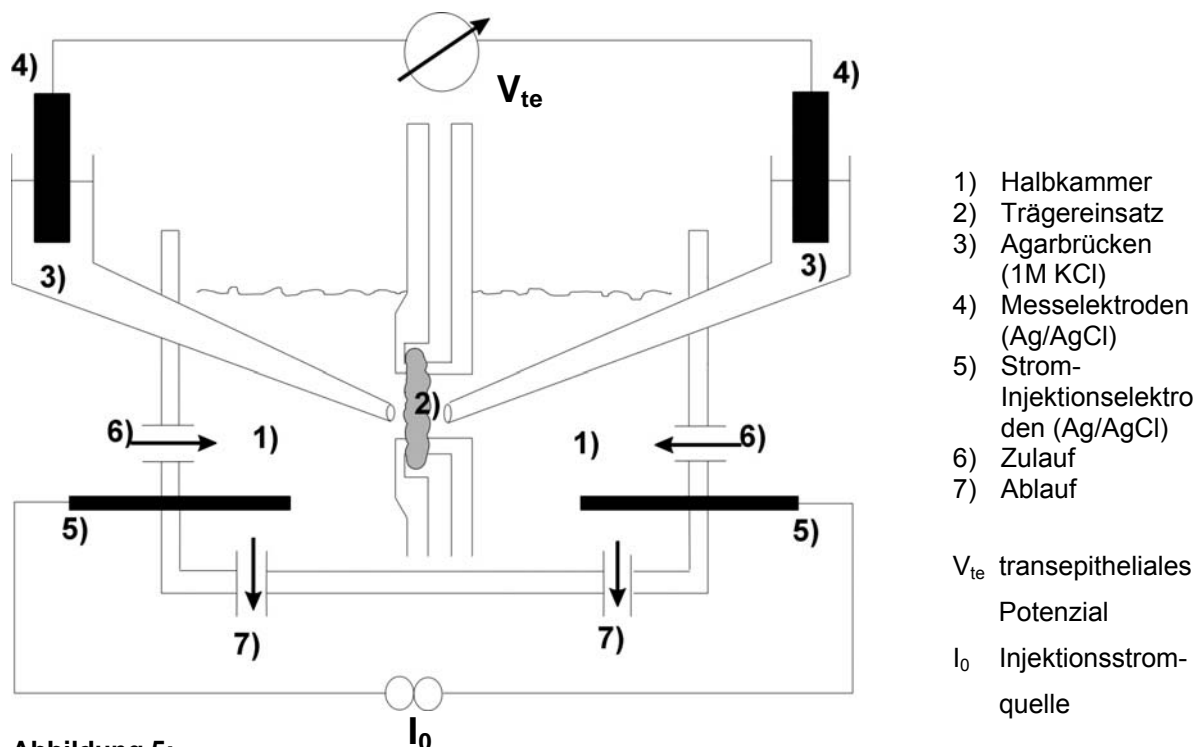


Abbildung 5:

Versuchsaufbau der Ussingkammer (schematische Zeichnung)

Die transepitheliale Potenzialdifferenz V_{te} , die von polaren, elektrogen transportierenden Epithelien aufgebaut wird, konnte hierbei über zwei Silberchlorid-Elektroden gemessen werden, die über Agarbrücken (2,5% Agar in 1M KCl) mit der Badlösung elektrisch in Verbindung standen und möglichst in räumlicher Nähe zur Epitheloberfläche platziert wurden. Die Verstärkung des Signals erfolgte über einen hochohmigen Differenzverstärker, der auch gleichzeitig einen Konstantstrompuls von $0,36\mu\text{A}$ für die Trachea und von $1,8\mu\text{A}$ für das Colon lieferte (Pulsgenerator 5.1, AD Elektronik, Freiburg, Deutschland). Dieser Strompuls (I_0) wurde über chlorierte Silberelektroden periodisch (7/min; Dauer 1s) injiziert, und führte zu einem Spannungsabfall ΔV_{te} . V_{te} und ΔV_{te} wurden kontinuierlich auf Schreiberpapier aufgezeichnet (LKB, Bromma 2210 Recorder 1-Channel, Schweden; L6012 Linseis, Selb, Deutschland). Nach Abzug des Leerwertes ($\Delta V'_{te}$ durch den Trägereinsatz ohne Gewebe, s. Abb. 6A/B) von ΔV_{te} wurde der transepitheliale Widerstand R_{te} nach dem Ohmschen Gesetz errechnet:

$$R_{te} = \frac{\Delta V_{te} - \Delta V'_{te}}{I_0}$$

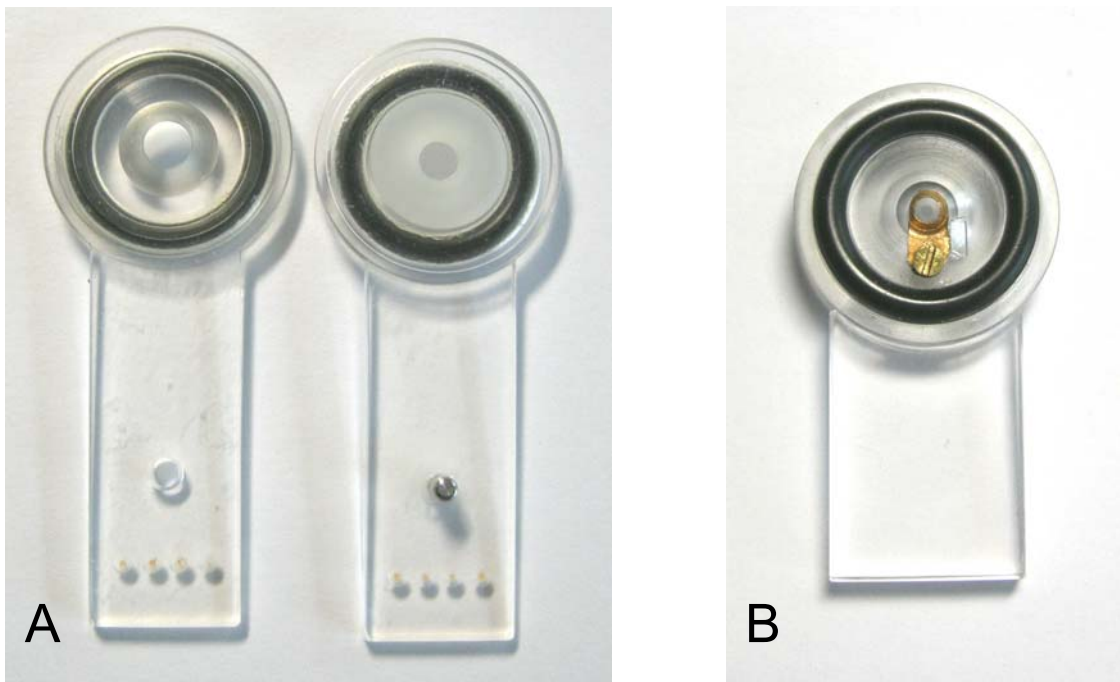


Abbildung 6:

- A: Trägereinsatz für Colongewebe mit $0,096\text{cm}^2$ Öffnung. Zu sehen ist das „Sandwich“-Prinzip.
- B: Trägereinsatz für respiratorisches Gewebe mit $0,0079\text{cm}^2$ Öffnung. Eine Metallklammer fixiert das Gewebe auf dem Trägereinsatz.

Der anschließend aus dem transepithelialen Potenzial V_{te} und dem ermittelten transepithelialen Widerstand R_{te} errechnete äquivalente Kurzschlussstrom I'_{sc} diente als Maß für den elektrogenen Transport des untersuchten Epithels:

$$I'_{sc} = \frac{V_{te}}{R_{te}}$$

I'_{sc} entspricht dem Nettostrom über das Epithel, der bei einem Kurzschluss zwischen luminaler und basolateraler Seite fließen würde. Das Volumen der beiden Halbkammern betrug 1,8ml. Die Temperatur wurde durch Erwärmung der perfundierten Lösung sowie durch eine beheizbare Bodenplatte unter der Ussingkammer während der Phase kontinuierlicher Perfusion konstant bei 37°C gehalten. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge von hBD-2 wurde der Badfluss während der Inkubation mit dem AMP unterbrochen. Begasung mit 100% O₂ hielt die Badlösung während dieser Zeit in Bewegung. Die Badtemperatur stabilisierte sich unter diesen Bedingungen bei 34°C.

2.2.1 Epitheliale Chloridsekretion

Das Colonepithel der Ratte wurde als Modellorgan für epitheliale Chloridsekretion verwendet (s. 1.2.1). Wistar-Ratten beider Geschlechter mit einem Gewicht von 200-350g wurden mit Hilfe von Isofloran (5%) kurz betäubt und mit Narcoren (Pentobarbital 160g/l; 1ml/kgKG) in eine tiefe Narkose versetzt und getötet. Anschließend wurde der Bauchraum durch Medianschnitt eröffnet. Nach Aufsuchen der linken Colonflexur wurde das Colon ca. 1cm oberhalb durchtrennt. Ein Glasstab (0,5cm Ø, 15cm lang) wurde vorsichtig eingeführt und von der Colonflexur bis in das Rektum vorgeschoben. Dann wurde das Colon möglichst schonend vom Mesocolon abgetrennt und auf dem Glasstab möglichst weit rektal reseziert. Das Präparat wurde in eisgekühlte Aufbewahrungslösung (s. 2.7) überführt. Eventuell verbliebene Mesenteriumreste wurden vollständig entfernt und die Muscularis propria stumpf durch Abstreifen abpräpariert. Ein ca. 1cm² großes Stück wurde schonend in den Träger (0,096cm² Öffnung; s. Abb. 6A) eingespannt und in die vorgewärmte und kontinuierlich perfundierte Ussingkammer überführt. Es entwickelte sich ein lumen negatives Potenzial. Der Versuchsverlauf ist im folgenden Abschnitt und in Abb. 7 dargestellt. Zur Charakterisierung der Transporteigenschaften wurde nach ca. 2-5min luminal 50µmol/l Amilorid eingewaschen. Die Hemmung des epithelialen Natriumkanals ENaC führte zu einem schnellen, teilweisen Verlust des lumen negativen Potenzials mit gleichzeitiger Zunahme von ΔV_{te} .

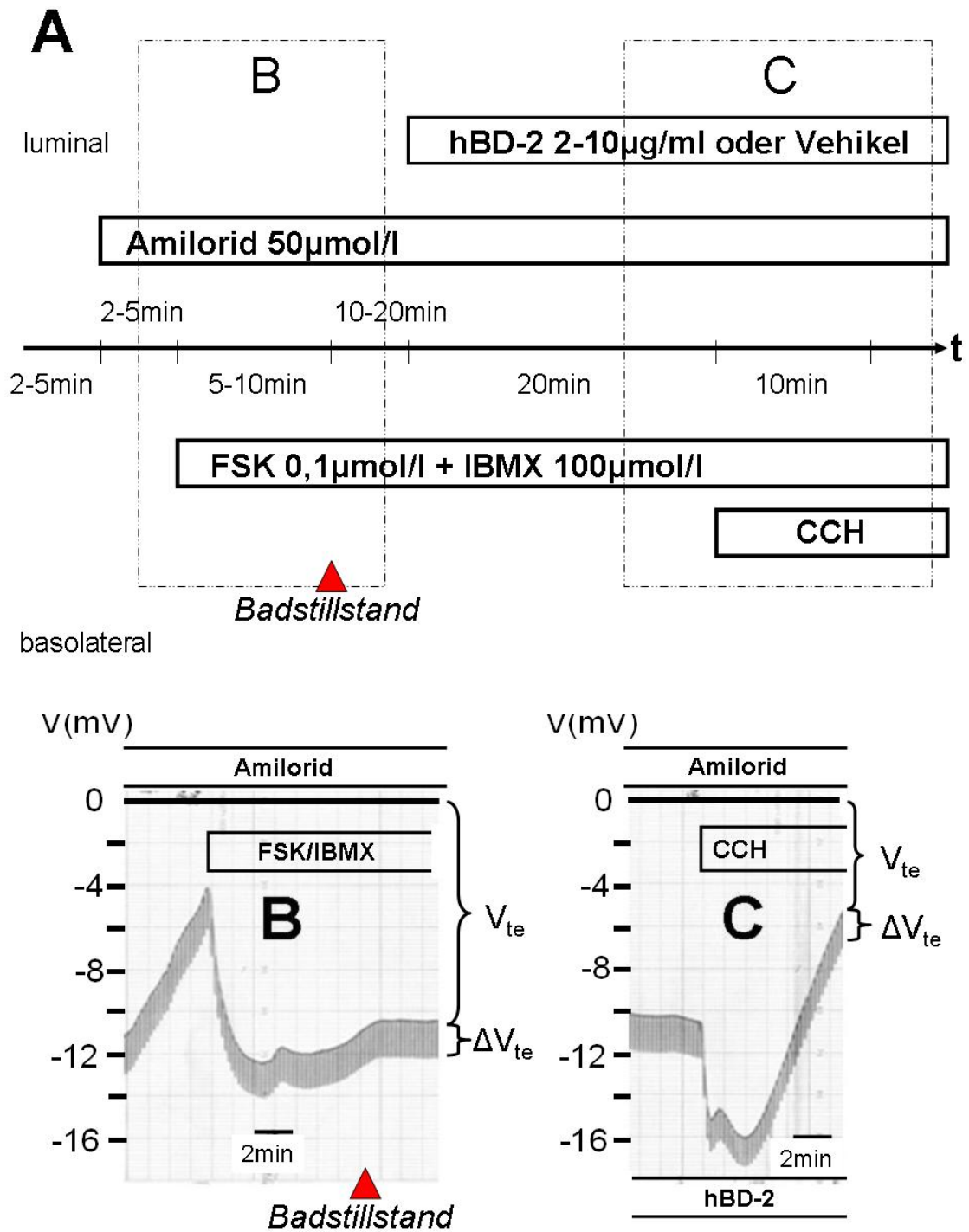


Abbildung 7:

- A: Experimenteller Ablauf in der Ussing-Kammer; Distales Colon; Zeitabstände und Substanzzugabe wie im Schema angezeigt. B, C: Abschnitte der gezeigten Originalaufzeichnungen
- B: Originalaufzeichnung; Stimulation der cAMP-abhängigen Chloridsekretion mit FSK/IBMX und Badstillstand
- C: Originalaufzeichnung; Stimulation der Ca^{2+} abhängigen Chloridsekretion innerhalb des gleichen Experiments mit CCH nach Inkubation mit hBD-2

Die luminale Badlösung enthielt während des weiteren Experiments kontinuierlich 50µmol/l Amilorid. Nach weiteren 2-5min wurde das Gewebe mit 0,1µmol/l Forskolin (FSK) und 100µmol/l Isobutylmethylxanthin (IBMX) basolateral perfundiert und maximal stimuliert. Es kam erneut zur Entwicklung eines negativen transepithelialen Potentials (s. Abb. 7B). Nach Erreichen stabiler Bedingungen (5-10min) wurde der Badfluss unterbrochen und das Epithel hatte 10-20min Zeit, sich auf die neuen Bedingungen einzustellen. Wenn erneut ein stabiles V_{te} vorlag, wurden entweder 1,8µl des Lösungsmittels (0,1% Essigsäure) oder 1,8µl Lösungsmittel mit 10µg/µl hBD-2 luminal appliziert und die Halbkammer durch fünfmaliges sanftes Auf- und Abpipettieren mit einer 500µl-Pipette (Eppendorf) gemischt. Die Endkonzentration von hBD-2 lag bei 10µg/ml. Nach einem Beobachtungszeitraum von 20min wurde zusätzlich basolateral 1,8µl einer 100mmol/l CCH Stammlösung hinzugegeben und gemischt (100µmol/l Endkonzentration, s. Abb. 7C). Damit wurde zusätzlich neben der cAMP abhängigen auch die Ca^{2+} abhängige Chloridsekretion beurteilt. Colonepithel mit einem $R_{te} < 50 \Omega \cdot cm^2$ oder einem $|V_{te}| < 7mV$ unter FSK/ IBMX wurden von der Wertung ausgeschlossen.

2.2.2 Epitheliale Natriumresorption

Für die Beurteilung der AMP-Wirkung auf die epitheliale Natriumresorption wurde die Trachea der Maus verwendet (s. 1.2.2). C57Bl6 Mäuse beider Geschlechter mit einem Gewicht von 17-27g wurden mit Hilfe von Isofloran (5%) in tiefe Narkose versetzt. Anschließend wurde zügig der Bauchraum eröffnet und das Tier nach Durchtrennung der Bauchaorta ausgeblutet. Nach Fixierung und Medianschnitt bis in den Halsbereich wurde das Fell vom Brustkorb stumpf abpräpariert. Der Brustkorb wurde durch zwei Schnitte direkt rechts und links des Sternums unter Schonung der Aa. subclaviae beidseits eröffnet. Der Thymus wurde entfernt, die Muskelschicht über der Trachea gespalten und der Ösophagus oberhalb des Hiatus abgesetzt und nach oral scharf von der Trachea getrennt ohne diese zu verletzen. Die so bereits in situ von Bindegewebe und Nachbarorganen befreite Trachea wurde auf der Höhe des Ringknorpels und der Bifurkation abgeschnitten und direkt in eisgekühlte Kontrolllösung überführt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die anteriore Seite des Präparats vorsichtig mit Hilfe einer feinen Federschere längs gespalten. Die distalen 3mm wurden abgetrennt, vorsichtig mit der Pars membranacea in einen Träger mit 0,0079cm² Gewebeoberfläche (s. Abb. 6B) eingespannt und in die vorgewärmte und kontinuierlich

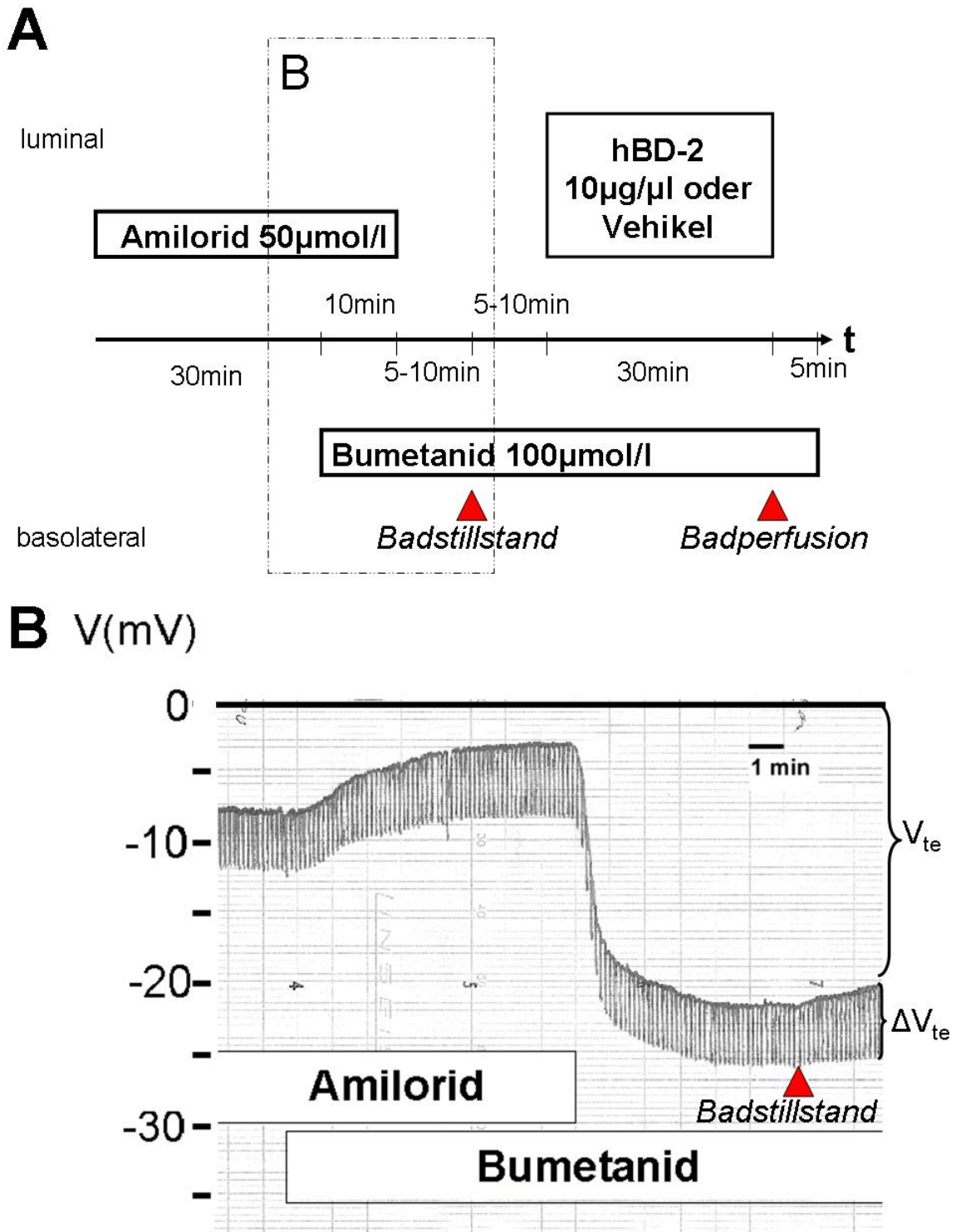


Abbildung 8:

- A: Experimenteller Ablauf in der Ussingkammer; Trachea C57Bl6-Maus
Zeitabstände und Substanzgabe wie im Schema dargestellt. B: Abschnitt der
gezeigten Originalaufzeichnung
- B: Originalaufzeichnung; Blockierung der Chloridsekretion durch Bumetanid und
Etablierung von V_{te} nach Auswaschen von Amilorid anhand eines
Originalperiments; Beschriftung analog zu A

perfundierte Ussingkammer überführt. Der weitere Versuchsverlauf ist im folgenden Abschnitt und in Abb. 8 dargestellt. Zur Stabilisierung des Gewebes nach Präparation wurde die Trachea luminal 40min mit $50\mu\text{mol/l}$ Amilorid perfundiert. Nach 30min wurde basolateral Bumetanid in einer Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$ eingewaschen und kontinuierlich belassen (s. Abb. 8A/B). Hiermit wurde die Chloridsekretion durch Hemmung des $\text{Na}^+\text{2Cl}^-\text{K}^+$ -Cotransporters in den Drüsen unterdrückt (s. Abb. 3a und Abschnitt 1.2.2). Nach Erreichen stabiler Bedingungen (ca. 10min) wurde Amilorid ausgewaschen und das lumenegative V_{te} konnte sich entwickeln (s. Abb. 8B). Die Badperfusion wurde anschließend unterbrochen und nach ca. 5-10min wurden bei stabilem V_{te} entweder $1,8\mu\text{l}$ des Lösungsmittels (0,1% Essigsäure) oder $1,8\mu\text{l}$ Lösungsmittel mit $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hBD-2 luminal appliziert. Die Endkonzentration in der Halbkammer lag bei $10\mu\text{g}/\text{ml}$. Nach einem Beobachtungszeitraum von 30min wurde die Badperfusion für 5min erneut gestartet und abschließend nochmals Amilorid ($50\mu\text{mol/l}$) von luminal appliziert, um den verbliebenen amilorid-hemmbareren I'_{sc} zu bestimmen. Experimente mit einem $R_{\text{te}} < 65 \Omega \cdot \text{cm}^2$ oder $V_{\text{te}} < |10\text{mV}|$ unter Bumetanid wurden aus der Wertung ausgeschlossen.

2.3 Patch-Clamp

2.3.1 Patch-Clamp Methode

Der Kontakt einer feinen Glaspipettenspitze ($\varnothing 0,5\text{-}2\mu\text{m}$) mit der Zellmembran führt zur Bildung einer besonders hochohmigen Abdichtung des unter der Pipette liegenden

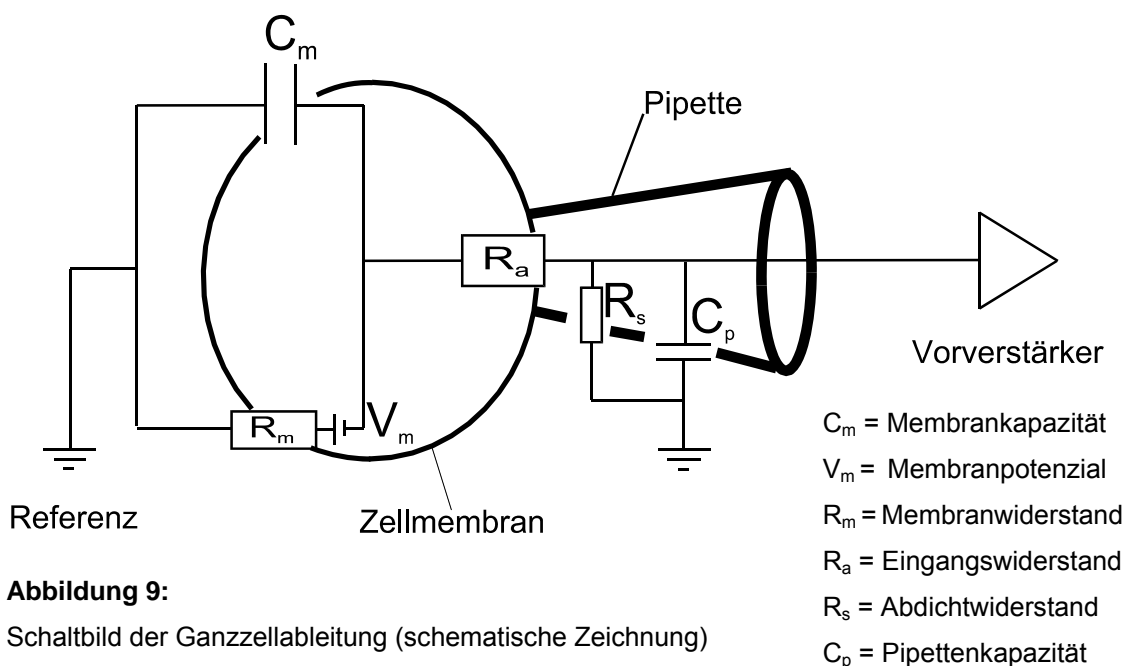


Abbildung 9:
Schaltbild der Ganzzelleableitung (schematische Zeichnung)

Membranflecks (Membranfleck: *engl.* „*patch*“) mit dem Pipettenglas. Die damit verbundene Minimierung des Rauschens ermöglicht die Ableitung kleinster Ströme z.B. durch Ionenkanäle. Mit dieser von Neher und Sakmann entwickelten Patch-Clamp Technik gelang es 1976 erstmals Einzelkanalströme an der Zelle darzustellen (42). Für die vorliegende Arbeit wurde das Verfahren der Ganzzelleableitung (Ganzzelleableitung: *engl.* „*whole cell configuration*“) verwendet, das eine Modifikation der Patch-Clamp Untersuchungen darstellt (43), bei der Ströme durch die gesamte Zellmembran gemessen werden. Hierzu wird der Membranfleck unter der Pipette durch kurzen Unterdruck eingerissen und so Zugang zum Zellinneren geschaffen.

2.3.2 Elektrisches Schaltbild der Zelle

Die Ganzzellkonfiguration der Patch-clamp Technik kann durch ein elektrisches Schaltbild dargestellt werden (s. Abb. 9). Eine Pipette sitzt auf der Zellmembran mit dem Abdichtwiderstand R_s auf und verfügt dabei über die Pipettenkapazität C_p . Der Widerstand über die Zellmembran (R_m) ist bei der Ganzzelleableitung mit dem Eingangswiderstand R_a in Serie geschaltet. Daraus ergibt sich für den Fall, dass der Abdichtwiderstand $R_s \gg 1\text{G}\Omega$ ist nach dem ersten Kirchhoff'schen Gesetz für den gemessenen Gesamtwiderstand $R_{\max} = R_a + R_m$. Nach Umformung entsteht die Gleichung für den Leitwert der Zellmembran:

$$\frac{1}{G_{\max}} = \frac{1}{G_a} + \frac{1}{G_m} \quad \text{und} \quad G_m = \frac{G_a \cdot G_{\max}}{G_a - G_{\max}}$$

Aus diesem Zusammenhang ergibt sich aber auch folgende Einschränkung für die Bewertung der Messungen:

1. Für die sinnvolle Berechnung von G_m muss G_a mehrfach größer als G_{\max} sein, damit sich ein Messfehler bei G_a nicht überproportional auf G_m auswirkt. Abb. 10 veranschaulicht diesen Zusammenhang für die Berechnung von G_m aus G_{\max} für die verschiedenen G_a Werte.
2. Der Pipettendurchmesser (Spitze) hat einen wesentlichen Einfluss auf G_a . Für die Praxis ergab sich, dass die Pipetten aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser: 1,5mm, Innendurchmesser: 0,83mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) mit einem automatischen Ziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente GmbH, München, Deutschland) auf einen Spitzendurchmesser von 1-2 μm ausgezogen und in einem Hitze-polierschritt geglättet wurden. Nach Befüllung mit einer im Ionengehalt dem Zytosol

entsprechenden Lösung (s. 2.7) hatte die Pipette einen Widerstand von 3-5M Ω , entsprechend 200-333nS.

Für die Auswertung der Membranleitwerte in Ganzzellmessungen wurden folgende Einschlusskriterien erhoben:

1. $G_a \geq 2 \cdot G_{\max}$
2. Wirkung von ATP und CCH (Erhöhung von G_m)

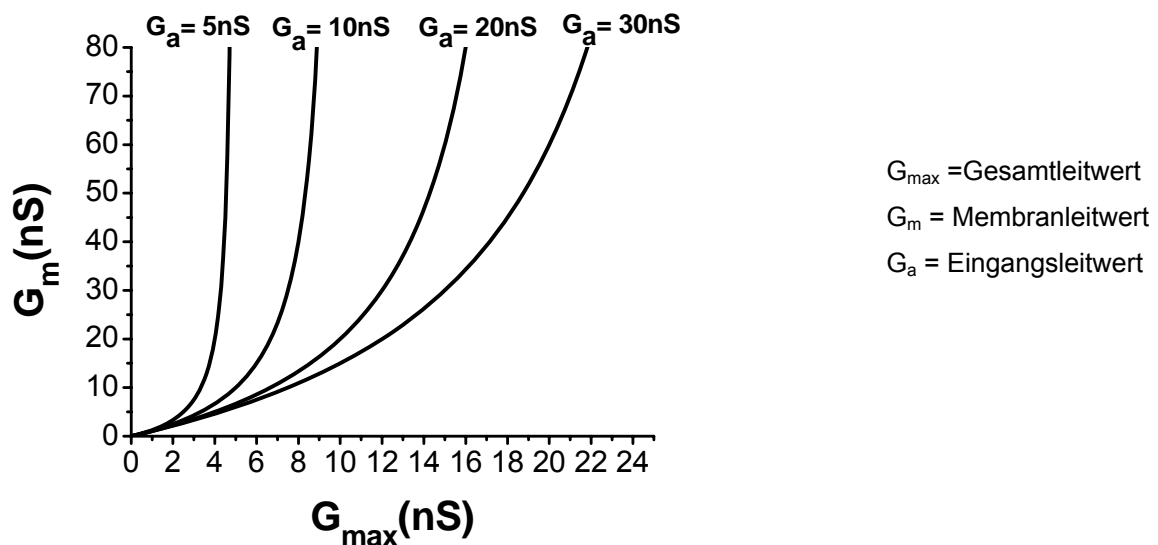


Abbildung 10:

Zusammenhang zwischen Gesamtleitwert, Membranleitwert und Eingangsleitwert

2.3.3 Messplatz und Geräte

Die mit Pipettenlösung (s. 2.7) gefüllte Pipette wurde zunächst über eine Ag/AgCl-Messelektrode gesteckt, und in einem Pipettenhalter befestigt (s. Abb. 11). Als Referenz in der Badlösung diente eine Ag/AgCl-Elektrode in einer mit 1M KCl-Lösung und Watte gefüllten Schlauchbrücke. Spannung und Strom wurden nach einer Tiefpassfilterung von 2000 Hz mit einem Besselfilter auf einem Oszilloskop (HAMEG Instruments) und einem Schreiber (GOULD, RS3200) dargestellt. Mittels einer Wassersäule konnte über den Pipettenhalter Druck oder Sog an die Pipette angelegt werden. Das Bad mit einem Volumen von ca. 1-1,5ml wurde von einem Heizring (Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Institutes Kiel, Deutschland) auf 37°C erwärmt. Über einen externen Zu- und Ablauf konnte

ein Badaustausch von 10-20ml/min ermöglicht werden. Die Zuleitung verlief zusätzlich durch einen beheizten Wassermantel. Für diese Arbeit wurden Experimente bei 37°C und bei Zimmertemperatur (20-24°C) durchgeführt. Vorverstärker, Pipettenhalter und Pipette (s. Abb. 11) konnten mittels eines ferngesteuerten Mikromanipulators vibrationsfrei auf allen Achsen bewegt werden. Ein inverses Mikroskop (Axiovert 135, ZEISS, Oberkochen, Deutschland) ermöglichte eine 400fache Vergrößerung. Die Apparatur stand auf einer druckluftgefederten Betonplatte, um Erschütterungen zu vermeiden. Der Messplatz wurde gegen elektromagnetische Einstrahlungen von einem Faraday-Käfig abgeschirmt. Alle Metallteile und Messgeräte waren auf einen gemeinsamen Bezugspunkt geerdet.

Elektrische Signale der Zelle wurden vom Vorverstärker auf einen computergesteuerten EPC-9 *Patch-Clamp* Verstärker der Firma HEKA übertragen und auf einer Festplatte gespeichert. Ein softwaregesteuerter Pulsgenerator löste definierte Spannungssprünge zur Ermittlung von G_{\max} aus Strom-Spannungskurven aus. Datenaufnahme und -analyse erfolgten mit der *Pulse* und *PulseFit* Software (Pulse v8.74, HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Deutschland).

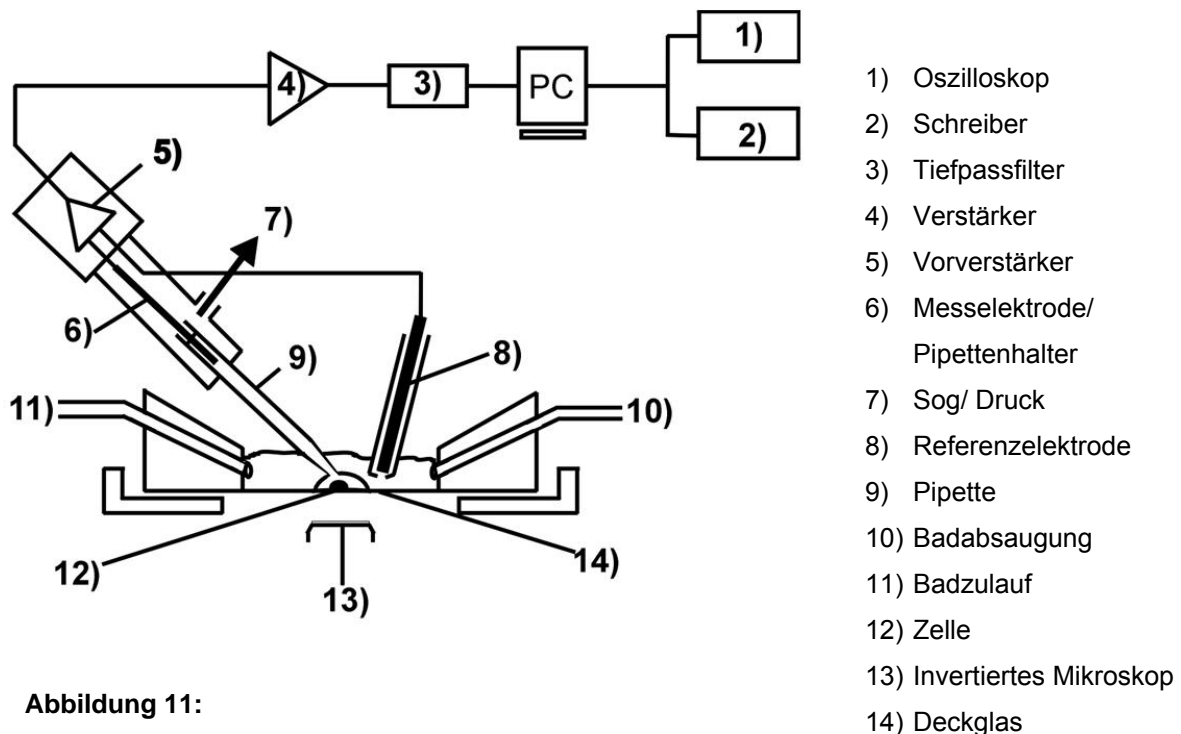


Abbildung 11:

Versuchsaufbau Ganzzelleableitung/ Patch-Clamp

2.3.4 Asymmetriepotenziale

Zwischen Bad-, Pipetten- und Referenzelektrodenlösung baut sich aufgrund der unterschiedlichen ionalen Zusammensetzung ein Asymmetriepotenzial (Asymmetriepotenzial: *engl. „Offset-Potential“*) auf. Dieses Potenzial wurde vor der Messung bestimmt und korrigiert.

Die Asymmetriespannung setzt sich aus folgenden drei Komponenten zusammen (s. Abb. 12):

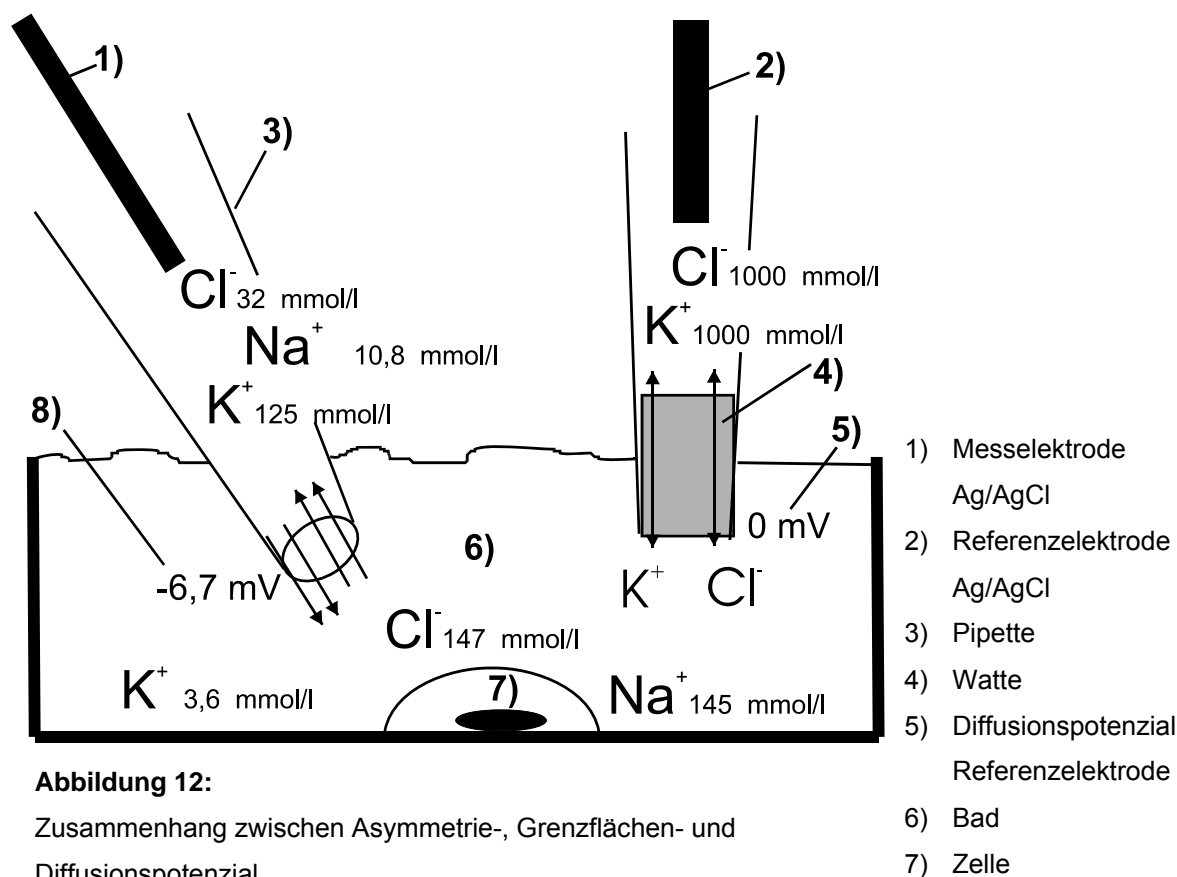


Abbildung 12:

Zusammenhang zwischen Asymmetrie-, Grenzflächen- und Diffusionspotenzial

1. Aufgrund der unterschiedlichen Cl^- Konzentrationen zwischen Referenz- und Messelektrode entsteht ein Asymmetriepotenzial, das mit der Nernst-Gleichung berechnet werden kann. Bei 37°C beträgt es an der Pipettenelektrode

$$E_{\text{Cl}^-} = \frac{R \cdot T}{F \cdot z} \cdot \ln \frac{[\text{Cl}^-]_{\text{Pip.}}}{[\text{Cl}^-]_{\text{Referenz}}} = -61\text{mV} \cdot \log \frac{[32\text{mmol}]_{\text{Pip.}}}{[1000\text{mmol}]_{\text{Referenz}}} = +92\text{mV}$$

R = allgemeine Gaskonstante ($8,314\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$); T = absolute Temperatur (310 K); F = Faraday-Konstante ($96485\text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$); z = Wertigkeit des Ions (-1)

2. Das Diffusionspotenzial verschiedener Ionen an der Grenzfläche zwischen Badlösung und Pipettenspitze wird aufgrund der unterschiedlichen Konzentration und Mobilität mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung unter Verwendung der Ionenmobilitäten (m) berechnet.

$$E_{LJ} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{m_{Na^+} \cdot [Na^+]_{Bad} + m_{K^+} \cdot [K^+]_{Bad} + m_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_{Pip.} + m_{Glu^-} \cdot [Glu^-]_{Pip.}}{m_{Na^+} \cdot [Na^+]_{Pip.} + m_{K^+} \cdot [K^+]_{Pip.} + m_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_{Bad} + m_{Glu^-} \cdot [Glu^-]_{Bad}} = -11mV$$

$$m_{Na^+} = 0,6378 (Na^+); m_{K^+} = 0,9109 (K^+); m_{Cl^-} = 0,9536 (Cl^-); m_{Glu^-} = 0,5 (Glukonat)$$

3. Zwischen der KCl-Referenzelektrode und der Badlösung entsteht ein weiteres, vernachlässigbares Diffusionspotenzial, weil der Wert des Logarithmus weitgehend durch die Terme für die Referenzelektrode dominiert wird und die beiden Ionen K^+ und Cl^- ähnliche Mobilitäten besitzen.

$$E_D = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{m_{K^+} [K^+]_{Ref.} + m_{Cl^-} [Cl^-]_{Bad} + m_{Na^+} [Na^+]_{Ref.}}{m_{K^+} [K^+]_{Bad} + m_{Cl^-} [Cl^-]_{Ref.} + m_{Na^+} [Na^+]_{Bad}} \approx 0,08mV$$

Während das Elektrodenpotenzial der Ag/AgCl Elektroden konstant bleibt, verschwindet das Potenzial an den Pipettenspitze, sobald diese von der Zellmembran abgedichtet wird. Dementsprechend wurden die Messungen der Pipettenspannung systematisch um -10mV korrigiert, nachdem die Spannungsmessung mit offener Pipette im Bad auf null abgeglichen war.

2.3.5 Ganzzelleableitungen an HT-29 Zellen

Die Messungen an HT-29 Zellen wurden mit einem abwechselnden Spannungsklemm- und Nullstromklemm-Protokoll durchgeführt. Zur Erstellung der Strom-Spannungs-Kurve wurden zwei Protokolle verwendet.

- Für die akute Untersuchung von AMPs an HT-29 Zellen wurde die Spannung jeweils ausgehend vom Membranpotenzial in 4x10mV Schritten zuerst zu negativeren und anschließend zu positiveren Potenzialen geklemmt (s. Abb. 13). Zwischen den Spannungsklemmprotokollen wurde das Membranpotenzial für 5 Sekunden ermittelt.
- Waren die Zellen mit AMPs langzeitinkubiert, wurde von einem Potenzial von -30mV für je 0,2 Sekunden in 15mV Schritten bis +15mV depolarisiert (s. Abb.14). Zwischen den Spannungsklemmprotokollen wurde das Membranpotenzial jeweils für 2,5 Sekunden mit Hilfe des Nullstromklemm-Protokolls ermittelt.

In Ganzzellaufzeichnungen wurde überprüft, ob hBD-2 eine akute Wirkung auf die Ca^{2+} Signaltransduktion und die damit verbundenen Leitwertänderungen ausübt. Als Positivkontrolle für den Ca^{2+} Signalweg und die Chloridsekretion (s. 1.2.3) diente der purinerge Agonist ATP (30-50 $\mu\text{mol/l}$). ATP wurde für 1min akut über das Perfusionssystem appliziert. hBD-2 wurde mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ ebenfalls für ca. 1min appliziert.

Für die 24h-Langzeitinkubation wurden die Zellen wie unter 2.6.3 beschrieben mit hBD-2 vorbehandelt. In Ganzzellaufzeichnungen wurde der purinerge Agonist ATP (30 $\mu\text{mol/l}$) bzw. der muskarinerge Agonist CCH (100 $\mu\text{mol/l}$) für jeweils 1min appliziert.

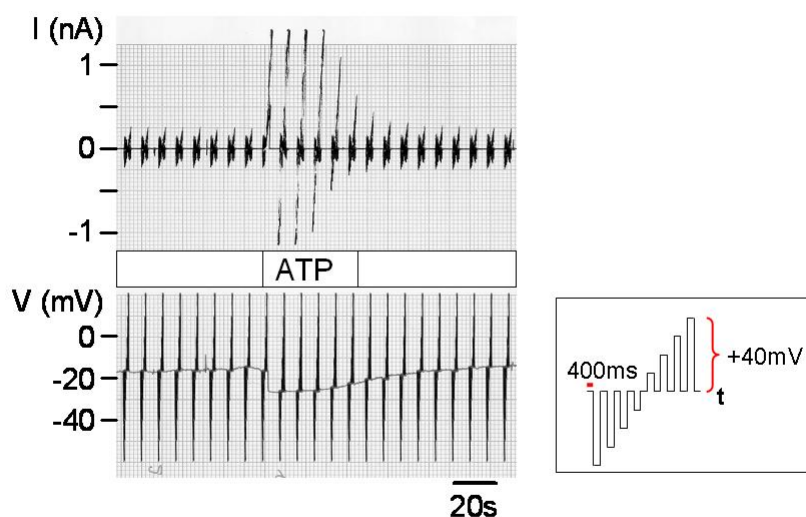
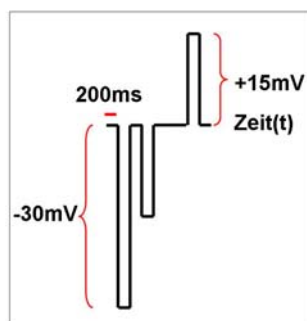


Abbildung 13:

Original Schreiberpapieraufzeichnung mit paralleler Aufzeichnung von Strom (oberer Streifen) und Spannung (unterer Streifen). Papiervorschub von 0,5mm/s. Gut zu erkennen ist der Wechsel von Nullstrom-Klemmprotokoll (Nulllinie in der Stromspur; Membranpotential in der Spannungsspur) und Spannungs-Klemm-Protokoll. Ausgehend von der Membranspannung wurde das Potenzial erst in 4x 10mV Schritten negativer und anschließend positiver geklemmt; s. Bild rechts)

Abbildung 14:

Spannungsklemmprotokoll mit Klemmbeginn bei -30mV und dann nachfolgend -15mV, 0mV und +15mV.



2.4 Fluoreszenzmessung

2.4.1 Messung von $[Ca^{2+}]_i$ mittels Fura-2

Fluoreszenzfarbstoffe ändern ihre Eigenschaften z.B. in Abhängigkeit vom pH-Wert oder der Ca^{2+} Aktivität in Lösungsmitteln. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 hat vier Carboxylatgruppen, die Bindungsstellen für Ca^{2+} darstellen (44). Die Dissoziationskonstante (K_D) für die Ca^{2+} Bindung beträgt 224nM. Bindet Ca^{2+} an Fura-2, so wird dessen Anregungswellenlänge zur kürzeren Wellenlänge verschoben. Beleuchtet man einen Fluoreszenzfarbstoff mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, so emittiert er Licht einer anderen Wellenlänge. Dieses Licht hat eine charakteristische Farbe, die durch das Emissionsspektrum beschrieben wird. Misst man die Intensität des Emissionslichtes bei der Anregung des Farbstoffes mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen, so ergibt sich das Anregungsspektrum des Farbstoffes, d.h. der Wellenlängenbereich, bei dem der Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Ein sog. Anregungsfarbstoff wird durch

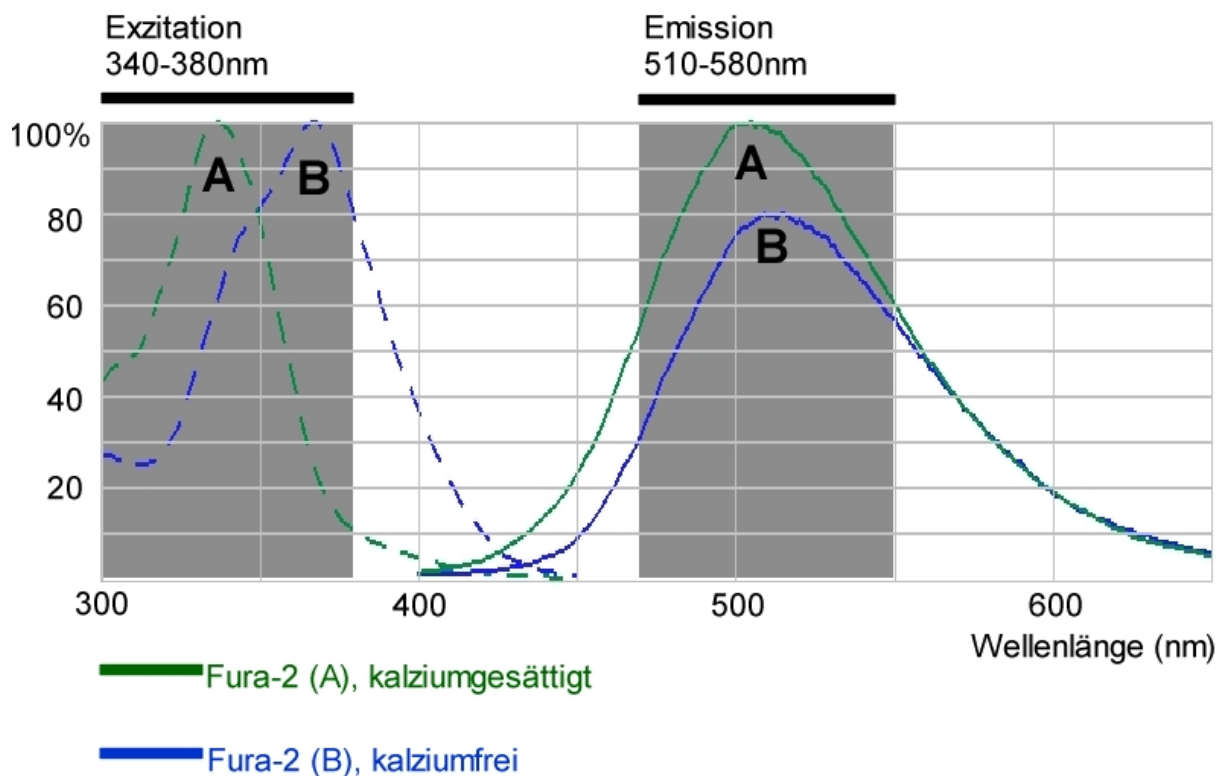


Abbildung 15:

Fluoreszenzspektra der Exzitation (detektiert bei 510nm) und Emission (angeregt bei 340nm) von Ca^{2+} freiem und gesättigtem Fura-2 bei pH 7,2.

(Quelle: Fluorescence Spectra Viewer[®] 2007, Invitrogen Corporation)

Konzentrationsänderungen des entsprechenden Ions in seinem Anregungsspektrum verschoben. Ein Emissionsfarbstoff wird entsprechend im Emissionsspektrum beeinflusst. Wird Fura-2 also z.B. mit Licht von 340nm Wellenlänge beleuchtet, emittiert der Farbstoff grünes Licht. Steigt die Ca^{2+} Aktivität, so nimmt die Intensität des emittierten Lichtes zu, die Farbe bleibt jedoch gleich. Wird Fura-2 mit Licht der Wellenlänge 380nm beleuchtet, verhält sich die Emissionsintensität umgekehrt zur Ca^{2+} Aktivität. Bildet man den Quotienten der Emissionsintensität 340nm/380nm, bekommt man ein Signal, das proportional zur Ca^{2+} Aktivität aber unabhängig von der absoluten Intensität ist, die von der Farbstoffkonzentration abhängt. Der isosbestische Punkt beschreibt eine Anregungswellenlänge bei der die Emission nicht Ca^{2+} abhängig ist. Der isosbestische Punkt für Fura-2 liegt bei 360nm (s. Abb. 15). Die Anregungslichtquelle war eine 75W Xenonlampe (s. Abb. 16). Ein optisches Gitter monochromatisierte das Licht für 350ms auf 340nm und anschließend für 310ms auf 380nm. Zwischen den Messungen wurde der Lichtweg durch einen Monochromatorverschluss

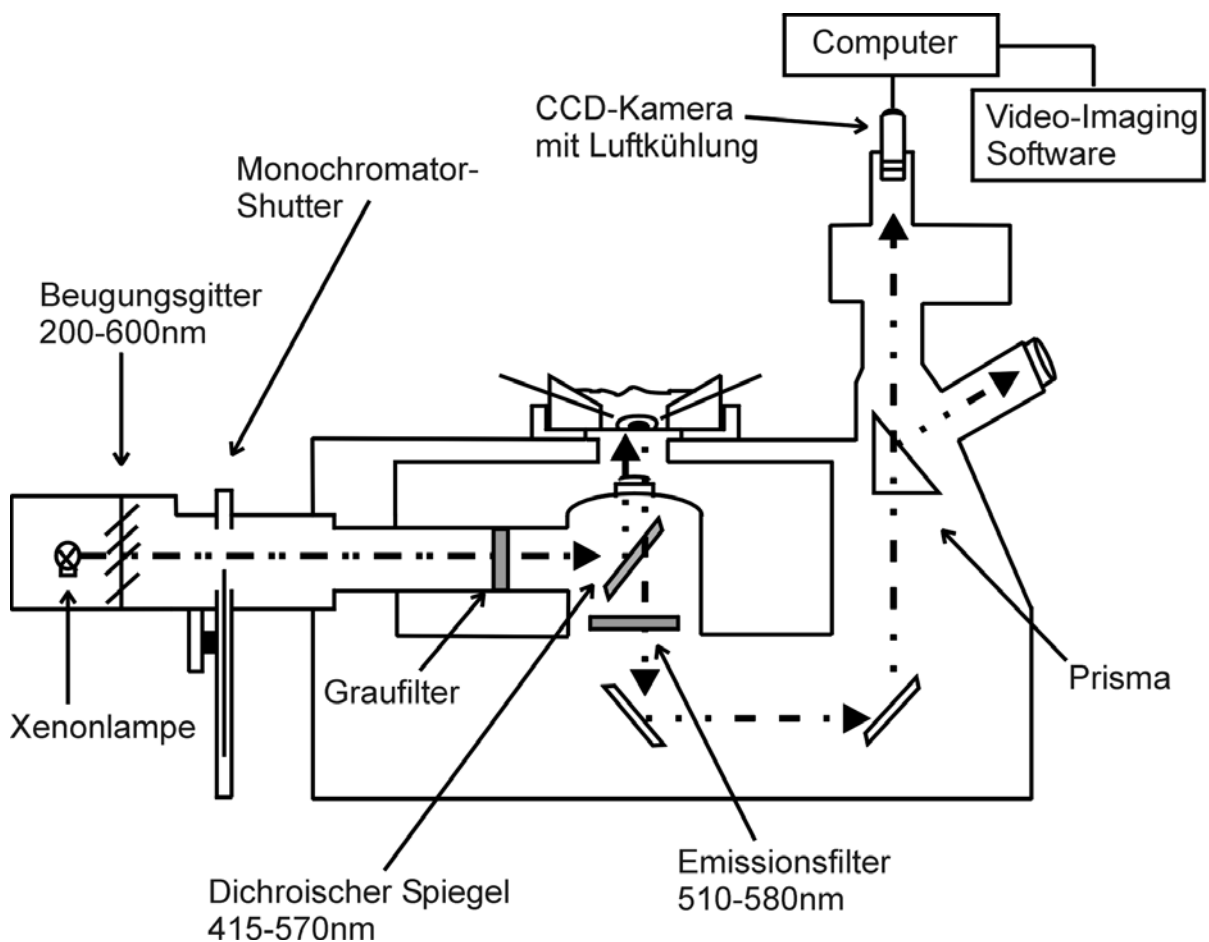


Abbildung 16:

Versuchsaufbau Fluoreszenzmessung

(Verschluss: *engl.* „*shutter*“; VisiChrome High Speed Polychromator System; Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland; Mikroskop: Axiovert 10, Carl Zeiss, Germany) blockiert, wodurch eine unerwünschte Bestrahlung des Präparates bei brennender Lampe vermieden werden konnte. Ein Graufilter begrenzte die Lichtintensität. Das Licht wurde an einem dichroischen Spiegel (Semrock, USA) durch ein 40x Objektiv zum Objekt hin reflektiert. Die nachfolgende Lichtemission des Fura-2 beladenen Objektes passierte das 40x Objektiv, den dichroischen Spiegel (415-570nm) und ein Emissionsfilter (510-580nm). Eine über ein Peltierelement tiefgekühlte CCD-Kamera mit 1,92 Mill. Pixel (Spot RT-SE, Diagnostic Instruments Inc., USA) lieferte die Daten, die mit *Binning 2* auf der Festplatte eines Computers gespeichert wurden. Unter Binning versteht man das Zusammenfassen benachbarter Pixel durch die Kamera, wodurch ein geringeres Rauschen erreicht wird. Bei *Binning 2* wurden 2x2 Pixel zusammengefasst, dabei wurde gleichzeitig die räumliche Auflösung verringert. Ein Computerprogramm (MetaFluor, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) konnte die Daten darstellen und analysieren. Der Verlauf des Experiments konnte auf zwei angeschlossenen Bildschirmen verfolgt werden.

Die HT-29 Zellen wurden in dieser Arbeit mit 5µM Fura-2-AM beladen und bei 37°C bei 5%CO₂ für 20-30min im Nährmedium inkubiert (s. auch 2.6.2). Anschließend wurde das Nährmedium und Fura-2-AM mit Kontrolllösung entfernt und ersetzt. Das Deckglas wurde mit Hilfe von Silikongel (GE Baysilone-Paste, Bayer Deutschland) flüssigkeitsdicht an die perfundierbare Messkammer angebracht und diese auf dem Objektisch des Mikroskops festgeklemmt.

2.4.2 20-Minuten-Inkubationsprotokoll

Für das 20-Minuten-Inkubationsprotokoll wurden die Zellen nach Einbau der Kammern mit Kontrolllösung gewaschen (5min). Die Messkammer wurde mit einem Heizring (Eigenbau des Physiologischen Institutes der CAU Kiel) auf 37°C erwärmt. Die Zuleitung des Perfusionssystems verlief durch einen ebenfalls erwärmten Wassermantel. Alle Experimente wurden bei 37°C durchgeführt. Nach der 5minütigen Waschung wurde die Messkammer mit ca. 15ml der Kontrolllösung perfundiert, die 1µg/ml hBD-1, hBD-2, hBD-3 oder HD-5 enthielt. Als Kontrolle diente die entsprechende Menge 0,1% Essigsäure in Kontrolllösung. Anschließend wurde der Badfluss für 20min angehalten und das entsprechende Peptid konnte auf die Zellen einwirken. Nach 20min wurde frische Kontrolllösung mit 100µmol/l CCH für 3min eingeleitet und anschließend ausgewaschen Für die Auswertung wurden pro Deckglas

und Experiment 6-12 Zellen ausgewählt. Die Werte wurden gemittelt und bildeten jeweils einen Datenpunkt.

2.4.3 24-Stunden-Inkubationsprotokoll

Für das Langzeitprotokoll wurden die HT-29 Zellen bereits vorab wie unter 2.6.3 beschrieben mit hBD-2 vorinkubiert. Nach Farbstoffbeladung und Überführung in die Messkammer (s. 2.4.1) wurden aufeinanderfolgend unter kontinuierlicher Perfusion zuerst 30µmol/l ATP für 200 Sekunden appliziert, sodann für 3min ausgewaschen und anschließend 100µmol/ CCH für 200 Sekunden appliziert und ebenfalls für 3min wieder ausgewaschen. Für die Auswertung wurden pro Deckglas 8-12 Zellen ausgewählt und gemittelt, die vorab auf die oben genannten Agonisten reagiert hatten.

2.5 hBD-2-ELISA

Um die tatsächliche Endkonzentration von hBD-2 im 24-Stunden-Langzeitexperiment zu überprüfen, wurde ein *Sandwich-ELISA* eingesetzt. Dazu wurde das Nährmedium der Kunststoffschälchen vor Experimentbeginn (s. 2.6.2) ohne Zusatz von fetalem Kälberserum gewechselt, da Bestandteile des Kälberserums mit den Peptiden interferieren oder den ELISA stören können. Direkt im Anschluss wurden 100µl Mediumüberstand als Vorkontrolle abgenommen und in sterilen 1,5ml Reaktionsgefäßen bei -20°C eingefroren. Danach erfolgte das Hinzupipettieren von hBD-2 oder Vehikel-Kontrolle (s. 2.6.3). Nach kurzer manueller Dreh- und Schwenkbewegung des Kunststoffschälchens zur Durchmischung wurden ebenfalls 100µl als Probe 0h entnommen und eingefroren. 24 Stunden später wurden erneut 100µl Mediumüberstand entnommen und als Probe 24h eingefroren. Alle Proben wurden nach ca. 5 Tagen zur hBD-2-Bestimmung aufgetaut.

Für den ELISA wurden 96-Loch-Platten (Nunc-Immuno, Omnitray, MaxiSorp™, Roskilde, Dänemark) für eine Stunde bei 37°C mit 50µl/Loch polyklonalen affinitätsgereinigten hBD-2-Ziegen-Antikörpern (Cell Concepts, Umkirch; 1µg/µl in 0,05 M Carbonat-Puffer, pH 9,6) beschichtet und inkubiert. Dann wurde die Flüssigkeit aus den Reaktionslöchern verworfen. Im Anschluss wurde mit 200µl einer 1%igen BSA-Lösung (w/v in PBS) für 10min bei 37°C geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Wieder wurde die Flüssigkeit aus jedem Reaktionsloch verworfen und danach dreimal mit 200µl Waschpuffer bestehend aus 0,1% Tween 20 (v/v in PBS) gewaschen. Zur Doppelwertbestimmung wurden

50µl der abgenommenen Mediumüberstände und aufgereinigtes hBD-2 für die Standardkurve mit den Konzentrationen 0ng/ml, 0,3125ng/ml, 0,625ng/ml, 1,25ng/ml, 2,5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml und 20ng/ml in die Löcher gegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit wiederum verworfen und die 96-Loch-Platten dreimal mit Waschpuffer (s. o.) gespült, um anschließend nochmals 50µl biotinylierten Ziegen-hBD-2-Antikörper (Cell Concepts; 0,2µg/ml in 0,1% Tween 20 v/v in PBS) pro Loch für 30min bei 37°C hinzuzugeben. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit dem oben aufgeführten Waschpuffer gewaschen und anschließend pro Loch mit 50µl Streptavidin Konjugat (Roche, Mannheim Deutschland 1:10000 in PBS +0,1% Tween 20) inkubiert, um eine Signalverstärkung zu erreichen. An das Streptavidin war das Enzym Peroxidase gekoppelt. Nochmals wurde die Platte für 30min bei 37°C inkubiert und erneut sechsmal gewaschen (s. o.). Als Entwicklungsreagenz wurde 50µl/Loch 2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfon-Säure (ABTS, Roche) hinzupipettiert. Dieses wird von Peroxidase zu einem grünlichen Farbstoff umgesetzt. Nach 15min Entwicklungszeit unter Lichtabschluss und bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 405nm in einem Photometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) gemessen. Schließlich wurde der ELISA mittels MS Excel 2003 ausgewertet.

2.6 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.6.1 HT-29 Zelllinie (ATCC® Number HTB-38)

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Kiehne (I. Medizinische Klinik/ Hormon- und Rezeptorlabor, Kiel) zur Verfügung gestellt. Sie war einfach zu kultivieren und wurde bis zu 30mal passagiert. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen (25cm², Sarstedt, USA) bei 37°C in wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂ Atmosphäre (Inkubator, Heraeus, Hanau, Deutschland). Pro Kulturflasche wurden 7ml McCoy-Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) verwendet. Zusätzlich waren dem Nährmedium 100U/ml Penicillin (Biochrom), 100µg/ml Streptomycin (Biochrom), 10% fetales Kälberserum (Biochrom) und 2mM L-Glutamin (Biochrom) zugesetzt. Alle 2-3 Tagen wurde das Medium mit einer automatischen Pipettierhilfe (Hirschmann) gewechselt.

2.6.2 Subkultivierung der HT-29 Zellen

In der Regel erfolgte eine Subkultivierung nach 4-5 Tagen bzw. nach Erreichen einer ca. 90%igen Konfluenz. Zu Beginn wurde das McCoy-Nährmedium entfernt und die Zellen mit 5ml PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, Dulbecco, Pasching, Österreich) gewaschen.

Dann wurden die Zellen mit 1,5-2ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Trypsin/EDTA 0,05/0,02% in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} ; L 2143 Biochrom AG) bei 37°C für ca. 5min inkubiert und anschließend durch vorsichtiges Spülen unter Sicht vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Die milchige Zellsuspension wurde in ein steriles 2ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und die Zellen wurden für 2min bei 2000 x g pelletiert (Sprout Tischzentrifuge, Biozyme, Oldendorf). Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zunächst in 2ml McCoy-Medium resuspendiert. Zwei Erhaltungskulturen wurden mit je 600-900µl Zellsuspension in 7ml McCoy-Medium angelegt. Für die Langzeitinkubationsversuche sowie für akute Fura-2-Messungen oder Patch-Clamp Versuche wurden Zellen (10-30µl der obigen Zellsuspension) auf sterile Deckgläser in Kunststoffschälchen (Sarstedt 35x10mm) in 2ml Zellkultur-Medium abgesiedelt.

Die Deckgläser (Roth, Karlsruhe, Deutschland 22mm) wurden vor Gebrauch steril mit Poly-D-Lysin beschichtet. Hierzu wurde ein Tropfen sterile Poly-D-Lysin Lösung (0,1mg/1ml) mit einer Pipette (Eppendorf, Deutschland) auf das Deckglas aufgetragen, verteilt und angetrocknet. Das Poly-D-Lysin fördert die Adhärenz der Zellen auf den Deckgläsern. Die Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe, Heraeus) statt.

2.6.3 Inkubation der HT-29 Zellen mit hBD-2 für 24h

Beim 24-Stunden-Inkubationsprotokoll mit hBD-2 wurde zunächst das Kulturmedium der Kunststoffschälchen mit 2 ml frischen Kulturmedium erneuert (s. 2.6.2) und anschließend mit 10µl hBD-2 [1mg/1ml] Stammlösung versehen. Hieraus ergab sich eine maximale Endkonzentration von 5µg/ml hBD-2 in jedem Schälchen (s. 2.6.2).

2.7 Lösungen und Substanzen

Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind nachfolgend aufgelistet.

Pipettenlösung: pH 7,2

95mmol/l K-Gluconat
30mmol/l KCl
1,2mmol/l NaH₂PO₄
4,8mmol/l Na₂HPO₄
5mmol/l Glukose
1,034mmol/l MgCl₂
1mmol/l EGTA
0,726mmol/l Ca-Gluconat
1mmol/l ATP

Kontrolllösung: pH 7,4

145mmol/l NaCl
0,4mmol/l KH₂PO₄
1,6mmol/l K₂HPO₄
5mmol/l Glukose
1mmol/l MgCl₂
1,3mmol/l Ca-Gluconat

Aufbewahrungslösung: pH 7,4

127mmol/l NaCl
5mmol/l KCl
5mmol/l Glukose
1mmol/l MgCl₂
1,25mmol/l CaCl₂
10mmol/l HEPES
5mmol/l Na-Pyruvat

Die Lösungen wurden vor den Experimenten auf den angegebenen pH-Wert eingestellt. Alle verwendeten Chemikalien waren von höchstem verfügbarem Reinheitsgrad und wurden, falls

nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen); Merck (Darmstadt); R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt); Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Kontrolllösung diente als extrazelluläre Standardlösung für alle Experimente. In der Aufbewahrungslösung wurde das Colon nach Präparation bei 4°C bis zum Einsetzen in den Gewebeträger aufbewahrt. Die Pipettenlösung diente der Füllung der Patch-Pipetten und stand in der Ganzzellkonfiguration in Verbindung mit dem Cytosol der Zelle.

2.8 Auswertung und Statistik

In den Grafiken werden die Versuchsergebnisse in der Form von Säulen oder Kurven als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben.

$$\text{SEM} = \frac{S_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

S_{n-1} = Standardabweichung der Stichprobe; n = Anzahl der durchgeführten Experimente

Für die Wirkung von Substanzen wurde der gepaarte T-Test im Vergleich zur Vorkontrolle durchgeführt.

$$t = \frac{|\bar{d}|}{\text{SEM}_d}$$

d = Mittelwert der gepaarten Beobachtungen; t = t-Wert

hBD-2-Gruppen und Vehikel-Gruppen wurden als ungepaarte Datensätze miteinander verglichen. Somit gab es zu jeder Versuchsgruppe eine Kontrollgruppe. Bei ungepaarten Daten kam der ungepaarte t-Test zum Einsatz.

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ ($p < 0,05$) wurden als signifikante Unterschiede angesehen. Signifikante Unterschiede sind im Text erwähnt und in den Abbildungen mit einem Stern (*) versehen.

3 Ergebnisse

Die Frage nach der Beeinflussung der Epithelfunktion durch das AMP hBD-2 untersuchten wir an zwei Epithelien mit gut charakterisierten physiologischen Transporteigenschaften: Colongewebe der Wistar-Ratte als Modell für die Chloridsekretion (s. 1.2.1) und respiratorisches Gewebe (s. 1.2.2) der C57Bl6-Maus als Modell für die Natriumresorption.

3.1 Einfluss von hBD-2 auf den elektrogenen Elektrolyttransport

3.1.1 Colon

Aus nicht gezeigten Vorversuchen war bekannt, dass hBD-2 auf unstimuliertes Colongewebe keinen akuten Einfluss zeigte. Aus diesem Grund wählten wir ein Inkubationsprotokoll von 20min und untersuchten das Epithel im sekretorischen Funktionszustand. Um definiertere und vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde deshalb zunächst die cAMP abhängige

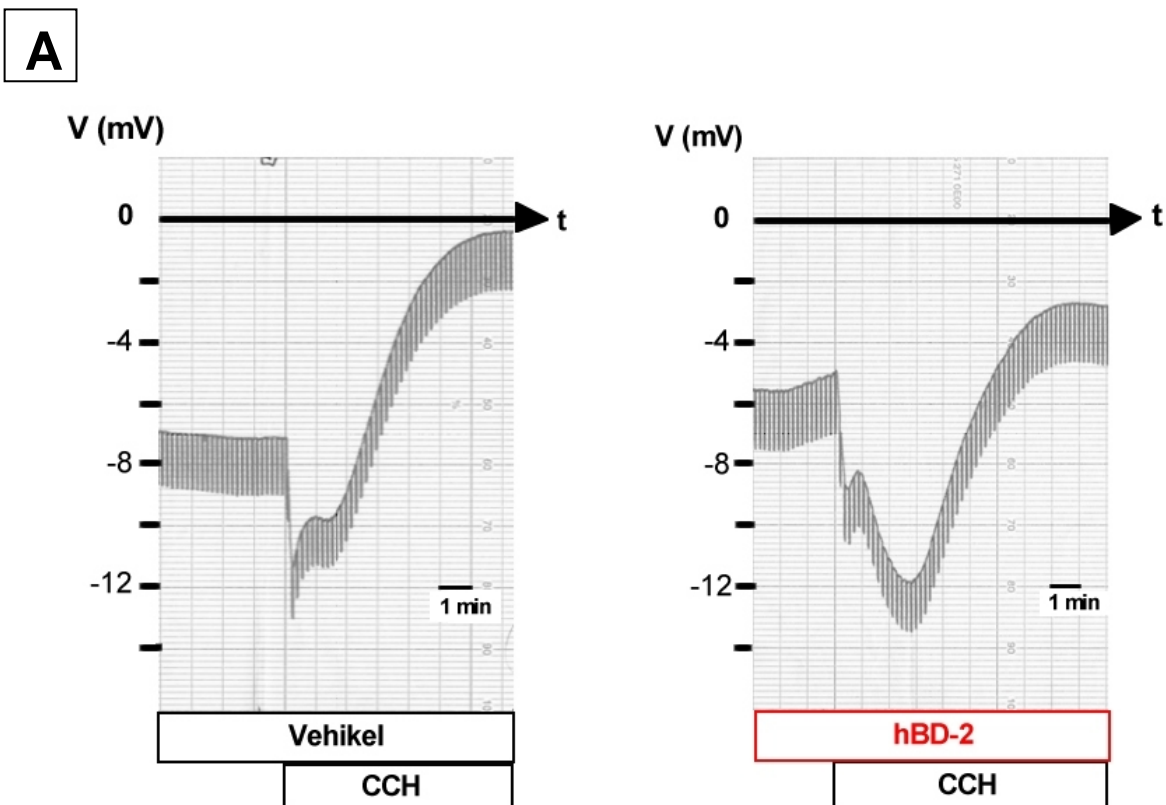


Abbildung 17:

A: Originalexperiment am Ende der 20minütigen Inkubation. Der durch CCH (100 μ mol/l) ausgelöste Effekt an einem Kontrollgewebe mit Vehikel im Vergleich zu einem Gewebe nach Inkubation mit hBD-2 (10 μ g/ml) ist deutlich verändert.

Chloridsekretion durch die Gabe von FSK und IBMX maximal stimuliert. Auch im Zeitverlauf von 20min wurden vergleichbare Werte erhalten (I'_{sc} nach 20min in der Kontrollgruppe bei $97\pm 9\%$, in der hBD-2 Gruppe bei $110\pm 12\%$ im Vergleich zum Zeitpunkt 0; s. Abb. 17B). Die Zugabe von hBD-2 hatte also keinen Einfluss auf den I'_{sc} innerhalb eines Zeitraumes von 20min.

Nach 20min wurde zusätzlich die Ca^{2+} abhängige Cl^- Sekretion durch Applikation von CCH induziert (Originalexperimente in Abb. 17 A). CCH führte zu einer Zunahme von I'_{sc} auf $-189\pm 28\mu A/cm^2$ in der Vehikel-Kontrollgruppe und auf $-209\pm 27\mu A/cm^2$ in der hBD-2-Gruppe (s. Abb. 17B). Bezogen auf den I'_{sc} zum Zeitpunkt 0 führte CCH im Kontrollgewebe zu einer I'_{sc} Zunahme von $189\pm 23\%$ und in dem mit hBD-2 vorbehandelten Colongewebe von $259\pm 22\%$ (s. Abb. 17C). Die Zunahme nach hBD-2 Behandlung war signifikant größer, als unter Kontrollbedingungen

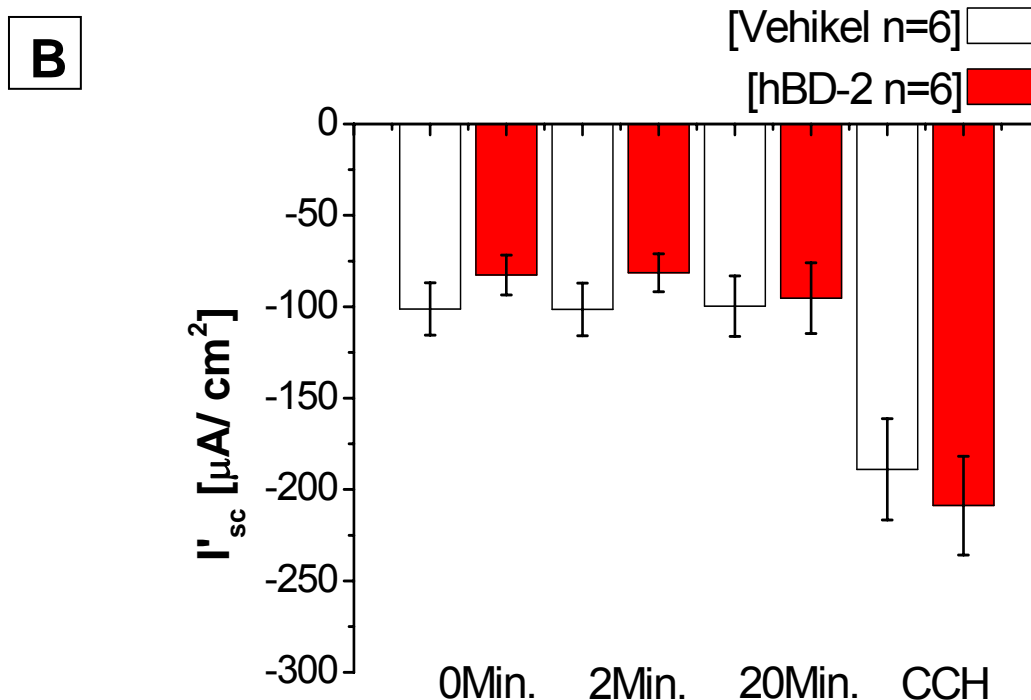
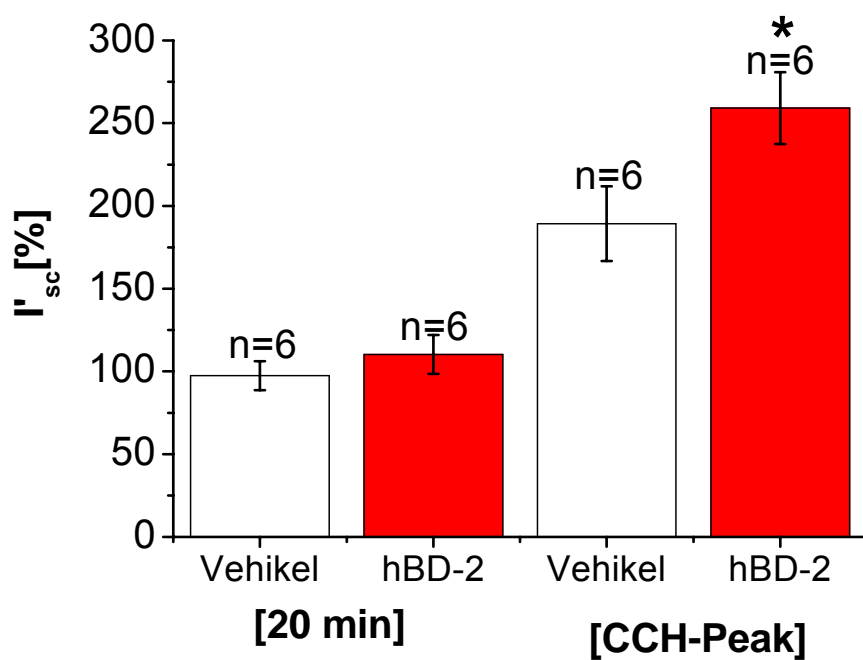


Abbildung 17:

B: Kurzschlussstrom I'_{sc} unter Kontrollbedingungen, zum Zeitpunkt 0-, 2-Min nach Gabe von hBD-2 und nach 20-Minuten-Inkubation mit hBD-2 ($10\mu g/ml$) oder Vehikel sowie nach zusätzlicher Gabe von $100\mu M$ CCH (Farbkodierung und Anzahl der unabhängigen Experimente wie angegeben).

C**Abbildung 17:**

C: Prozentuale Änderung des Kurzschlussstromes I_{sc} nach 20-Minuten-Inkubation und nach Gabe von CCH bezogen auf den Zeitpunkt 0 (Farbkodierung und Anzahl der unabhängigen Experimente wie angegeben).

3.1.2 Trachea

Die Trachea (s. 1.2.2) wurde als Na^+ resorbierendes Epithelgewebe ausgesucht, um den Einfluss von hBD-2 (s. 1.1.1 und 2.1) auf diese Epithelfunktion in der modifizierten Ussingkammer zu untersuchen (s. 2.2.2). Hierzu wurde respiratorisches Gewebe, das mit Vehikel für 30min inkubiert wurde, mit respiratorischem Gewebe, das mit hBD-2 ($10\mu\text{g/ml}$) für 30min inkubiert wurde, verglichen.

Der elektrogene Na^+ Transport in Mastrachea war stabiler im Vergleich zum Colon der Ratte, zeigte aber im Zeitverlauf eine leichte Abnahme. Der I'_{sc} des Kontrollgewebes nahm innerhalb der ersten 2min nach Zugabe der Vehikelkontrolle von $-151\pm 14\mu\text{A/cm}^2$ auf $-147\pm 14\mu\text{A/cm}^2$ ab. Dagegen nahm der I'_{sc} innerhalb der ersten 2min nach Zugabe von $10\mu\text{g/ml}$ hBD-2 von $-161\pm 18\mu\text{A/cm}^2$ auf $-166\pm 20\mu\text{A/cm}^2$ leicht zu (s. Abb. 18 A). Bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt 0 nahm der I'_{sc} in der Kontrollgruppe entsprechend um 1.8% ab. Die luminale Inkubation des respiratorischen Epithels der Maus mit hBD-2 ($10\mu\text{g/ml}$) führte dagegen nach 2min zu einer vorübergehenden Erhöhung des relativen I'_{sc} um 3.2% (s. Abb. 18 B, C).

Somit zeigte sich, dass hBD-2 in der Trachea den elektrogenen lumennegativen Nettostrom kurzfristig erhöhte.

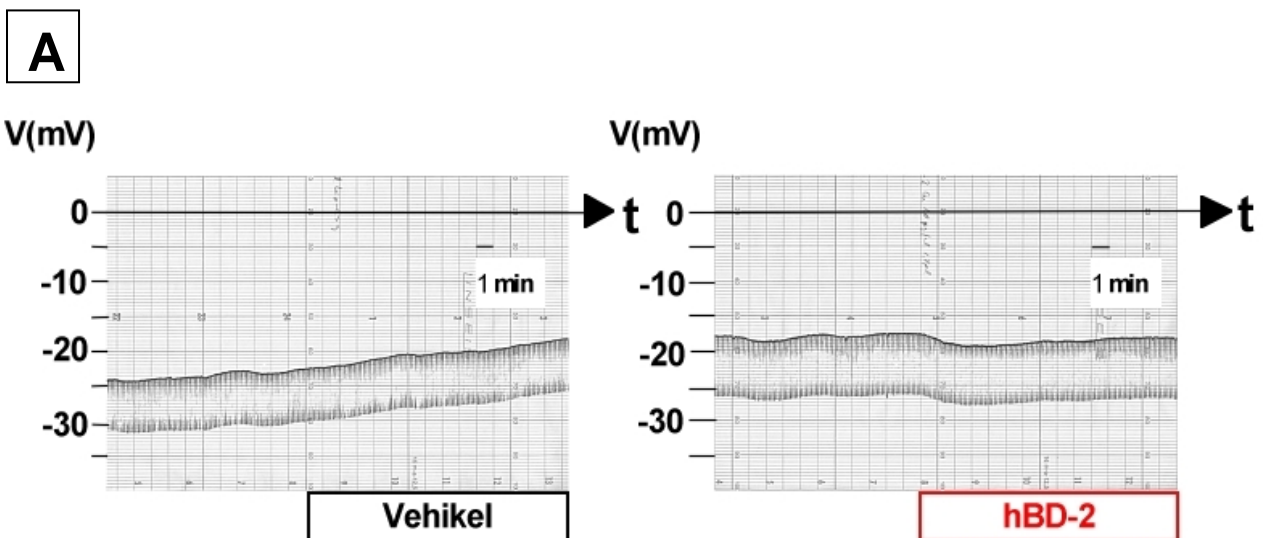


Abbildung 18:

A: zeigt ein Originalexperiment nach Vehikelzugabe unter Kontrollbedingungen und ein Originalexperiment nach Zugabe von hBD-2 ($10\mu\text{g/ml}$). Diese führte zu einer transienten Erhöhung des transepithelialen Potentials. Gezeigt sind ca. 10 Minuten vor und nach Zugabe.

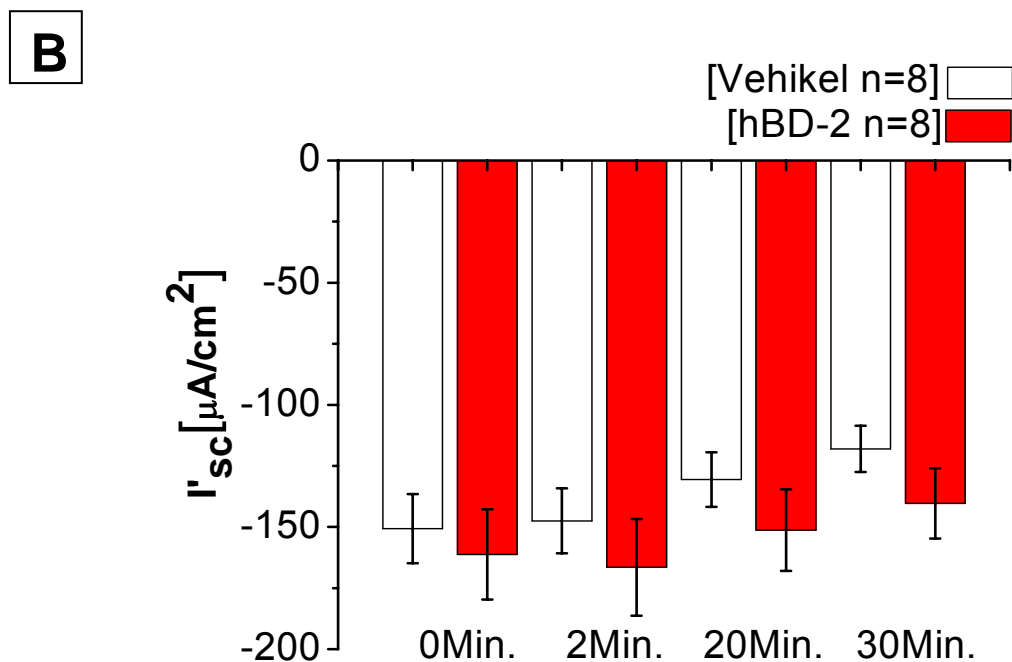


Abbildung 18:

B: Kurzschlussstrom I'_{sc} unter Kontrollbedingungen, zum Zeitpunkt 0, 2-, 20- und 30 Minuten nach Gabe von hBD-2 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Vehikel.

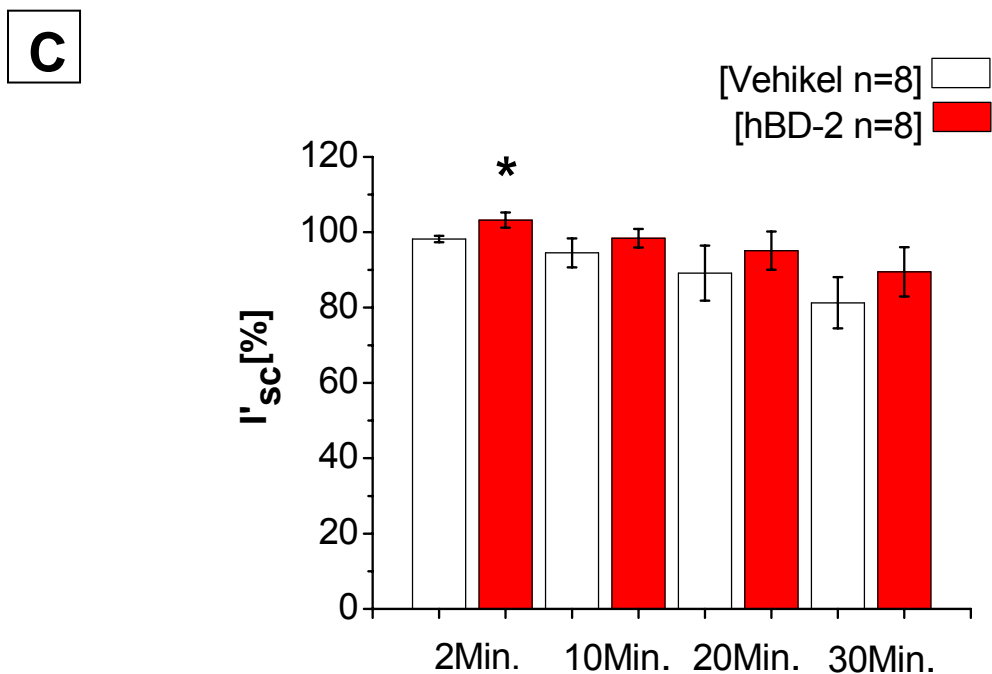


Abbildung 18:

C: Prozentuale Änderung des Kurzschlussstroms I'_{sc} nach 2-, 10-, 20- und 30-Minuten-Inkubation mit hBD-2 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Vehikel bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt 0.

3.2 Überprüfung von Porenbildung in der Zellmembran an HT-29 Zellen

Poren in der Membran, die für Ionen wie Na^+ , Cl^- oder K^+ permeabel sind, lassen sich mit der Patch-Clamp-Methode direkt als Leitwertzunahme bis zum Verlust der Zellintegrität und Messbarkeit nachweisen. Porenbildung mit sekundärem extrazellulären Ca^{2+} Einstrom, führen bereits bei geringen Konzentrationsänderungen in dieser Modellzelle über Ca^{2+} sensitive Chloridkanäle ebenfalls zu messbaren Änderungen in der Ganzzelleableitung. Die akute hBD-2-Wirkung wurde direkt mit der Wirkung des purinergen Agonisten ATP ($30\mu\text{M}$) verglichen. Die Abbildung 19 zeigt keine akute Wirkung nach Gabe von $5\mu\text{g/ml}$ hBD-2 auf die Ca^{2+} Signaltransduktion oder die Membranpermeabilität von HT-29 Zellen. In der Schreiberaufzeichnung der Teilabbildung C ist nach hBD-2 Zugabe weder eine Zunahme im Strom noch eine Änderung im Membranpotenzial offensichtlich. Im Vergleich dazu führte die Aktivierung der Ca^{2+} Signaltransduktion durch ATP ($30\mu\text{mol/l}$) zu einer massiven Stromzunahme (s. Abb. 19 C). Zusammengefasst ergab sich für ATP eine Erhöhung des Membranleitwertes von $2,8 \pm 2,96\text{nS}$ auf $30,9 \pm 9,27\text{nS}$ (s. Abb. 19 A, B).

hBD-2 führte in den verwendeten Konzentrationen nicht zur Porenbildung in der Zellmembran.

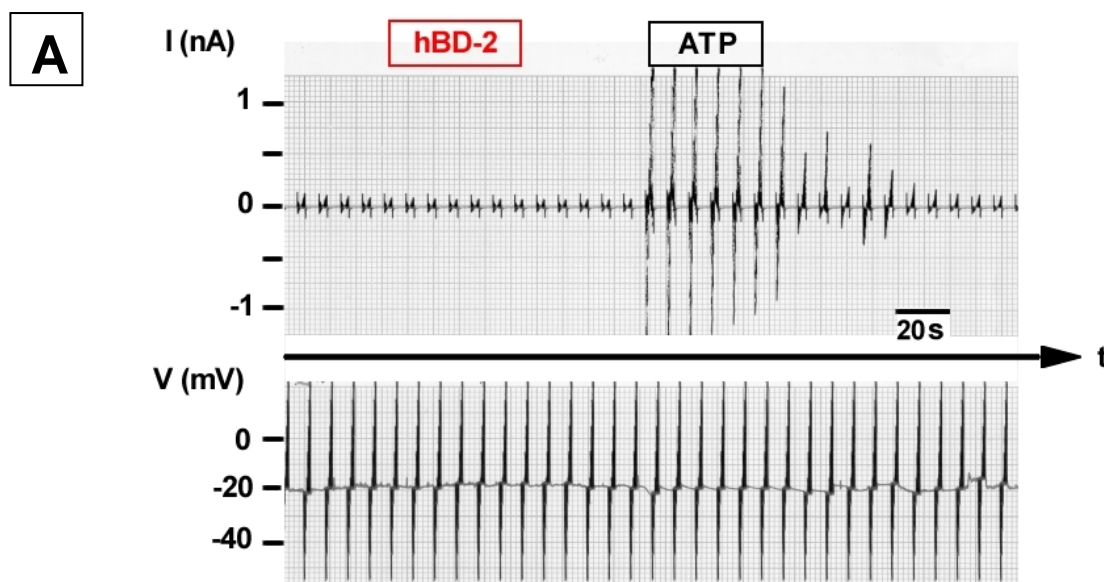


Abbildung 19:

Patch-Clamp-Experimente an HT-29 Zellen

- A: Originalexperiment im Zeitverlauf: obere Spur Membranstrom und untere Spur alternierend aufgenommenes Membranpotenzial; Zugabe von ATP führte im Gegensatz zu hBD-2 zu einer deutlichen Zunahme des Stromes im Spannungsklemmprotokoll.

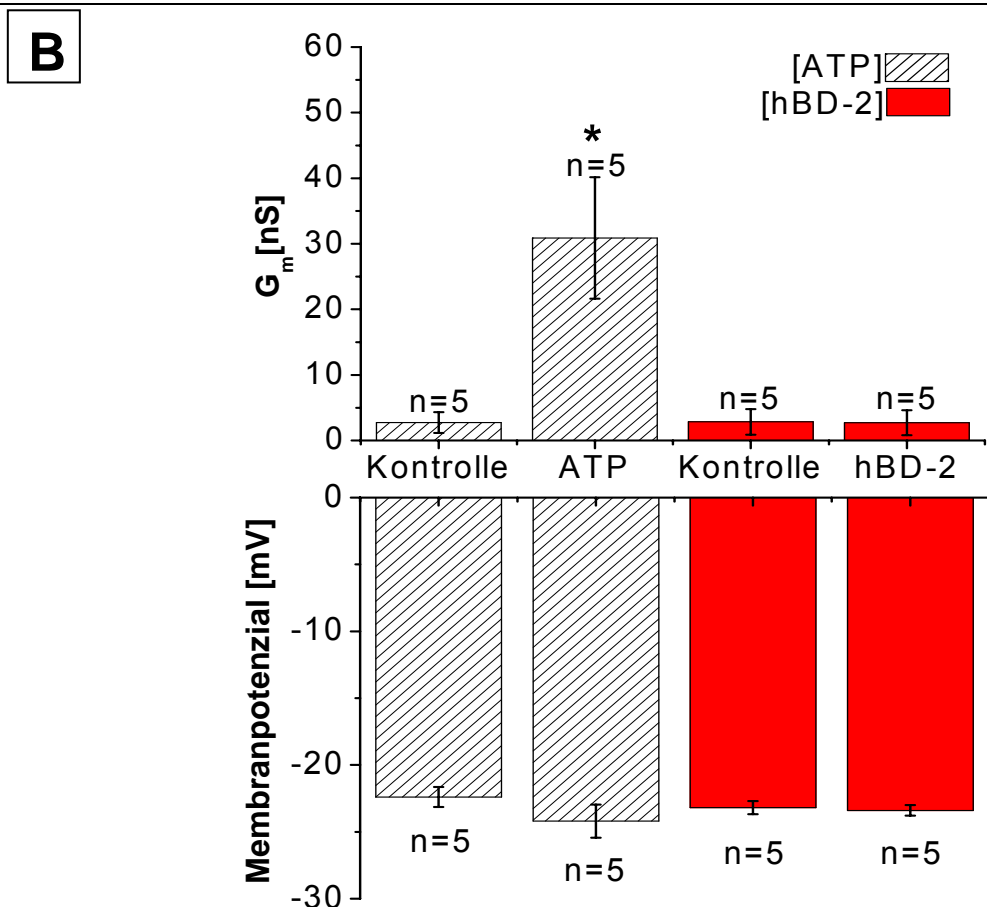


Abbildung 19:

B: Vergleich Leitwert (G_m) und Membranpotenzial zwischen akuter Gabe von ATP (30 μ mol/l) und hBD-2 (5 μ g/ml) an HT-29 Zellen.

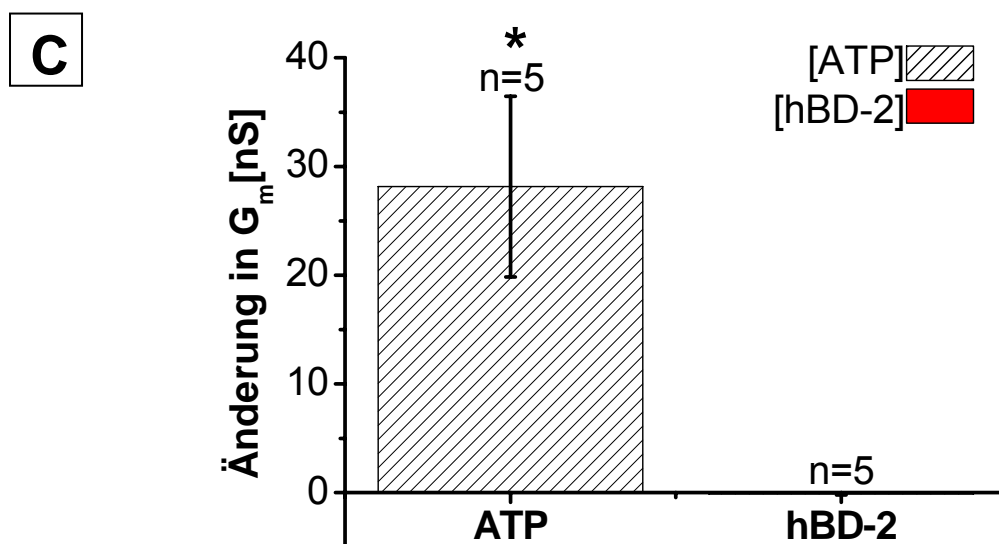


Abbildung 19:

C: Vergleich Änderung des Membranleitwertes zwischen akuter ATP und hBD-2 Gabe bezogen auf den Ausgangswert unter Kontrollbedingungen.

3.3 Wirkung von AMPs auf die Ca^{2+} Signaltransduktion (akut)

HT-29 Zellen in der Zellpassage 21-23 und 4-7 (s. 1.3. und 2.6.1) wurden mit der Fluoreszenzmessung (s. 2.4 und 2.4.2) untersucht und hierzu für 20min mit den humanen Defensinen hBD-1,-2,-3, HD-5 und Vehikel inkubiert. Anschließend wurde die Ca^{2+} Antwort nach Stimulation mit CCH (100 $\mu\text{mol/l}$) untersucht. Die Abbildung 20 A zeigt jeweils ein Originalexperiment für alle vier Defensine und die Vehikel-Kontrollgruppe. Die Unterbrechung des Badflusses am Anfang der 20minütigen Inkubationsperiode führte unter allen fünf Bedingungen zu einer geringfügigen Abnahme des Fluoreszenzquotienten (Ratio), die in den folgenden 20min konstant blieb. Das Experiment unter hBD-2 zeigt im Vergleich zu allen anderen Bedingungen einen deutlich größeren Ca^{2+} Transienten nach CCH Applikation. Der Ca^{2+} Transient ist für alle Experimente in Abbildung 20 B zusammengefasst. Zum Zeitpunkt 90s nach CCH Zugabe betrug die Ratio für die Vehikel-Kontrollgruppe $1,38 \pm 0,04$, für hBD-1 $1,39 \pm 0,06$, für hBD-3 $1,31 \pm 0,05$, für HD-5 $1,31 \pm 0,03$ und war für hBD-2 signifikant auf $1,54 \pm 0,06$ erhöht. Zur weiteren Analyse wurde die Fläche unter der Kurve (AUC: engl.: „area under the curve“) für die ersten 90s des Transienten berechnet. Die Daten sind in Abbildung 20 C zusammengefasst. Nur nach Vorinkubation war

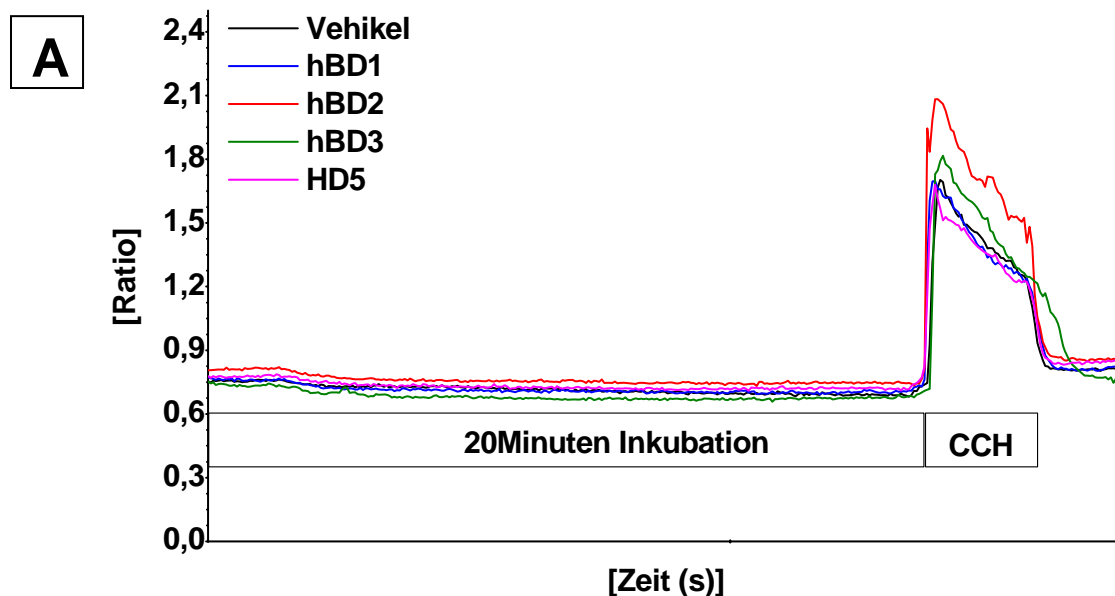


Abbildung 20:

A: Fluoreszenzquotient (Ratio) als Maß der intrazellulären Ca^{2+} Aktivität aller Mittelwertkurven der Originalexperimente mit Vehikel, hBD-1,-2,-3 und HD-5 (5 $\mu\text{g/ml}$). Nach 20-Minuten-Inkubation bei stehendem Bad wurden 100 μM CCH appliziert.

die Fläche mit $19,9 \pm 0,66$ gegenüber den Vehikel-Kontrollbedingungen mit $16,1 \pm 0,92$ erhöht. Somit erhöhte hBD-2 den CCH induzierten Calciumtransienten nach 20minütiger Vorinkubation in HT-29 Zellen.

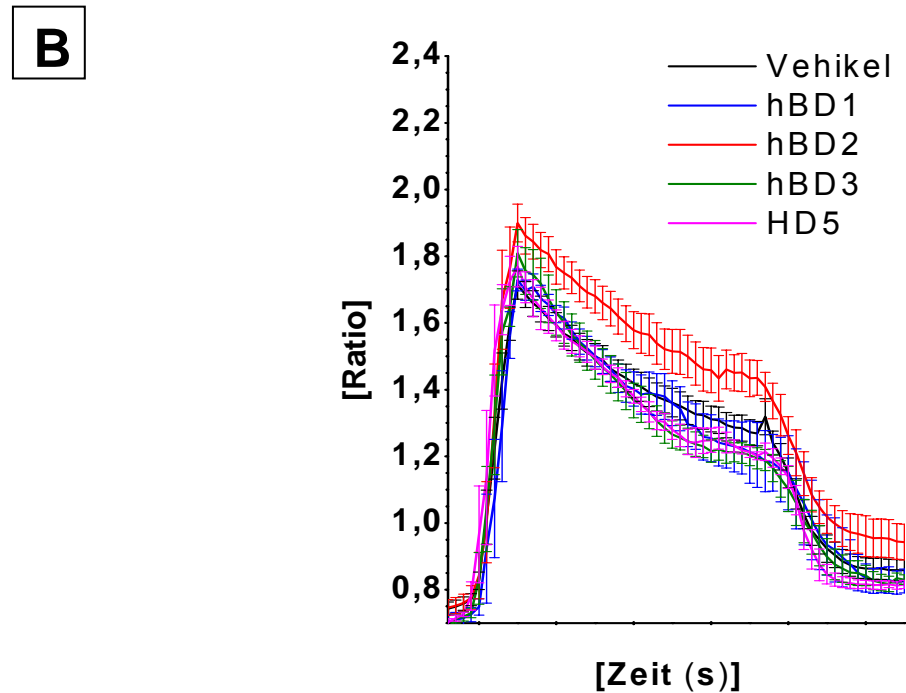


Abbildung 20:

B: Vergleich aller mit CCH ($100\mu\text{mol/l}$) induzierbaren Mittelwertkurven, die nach 20-Minuten-Inkubation mit Vehikel ($n=13$), hBD-1 ($n=4$), hBD-2 ($n=8$), hBD-3 ($n=8$) und HD-5 ($n=4$) gemessen wurden.

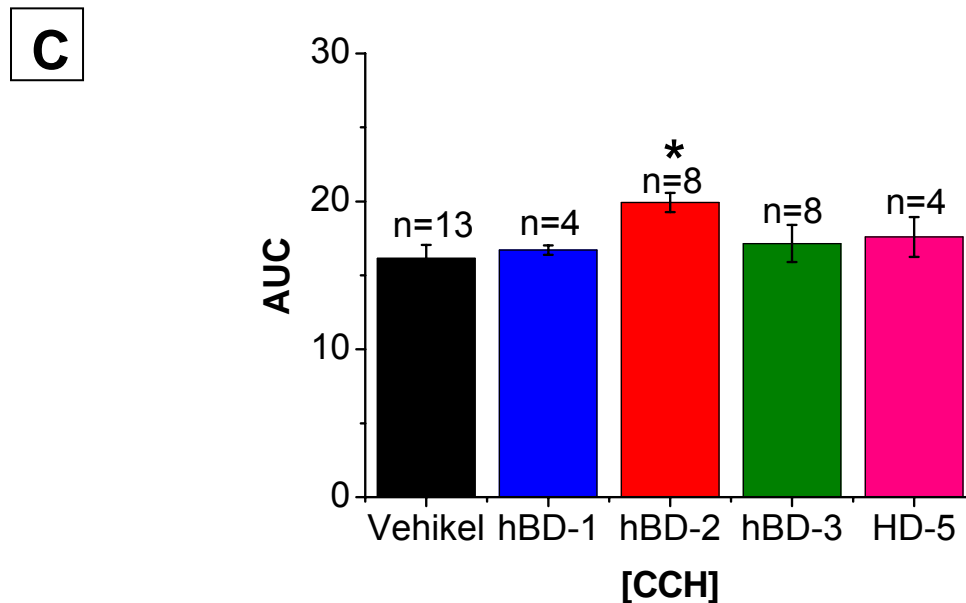


Abbildung 20:

C: Integrale der Fluoreszenzquotienten über die Zeit der durch CCH induzierbaren Ca^{2+} Antwort nach 20minütiger Inkubation mit Vehikel, hBD-1,-2,-3 und HD-5.
(AUC: engl. „area under the curve“)

3.4 Wirkung von AMPs auf die Ca^{2+} Signaltransduktion (chronisch)

Epithelzellen des Magen-Darmtraktes werden bei der Auseinandersetzung mit der bakteriellen Flora vermutlich längere Zeit mit AMPs konfrontiert. Somit stellte sich im Laufe der Versuchsreihen die Frage nach der Langzeiteinwirkung von hBD-2. Hierfür untersuchten wir HT-29 Zellen in der Ganzzelleableitung und der Fluoreszenzmessung nach 24-stündiger Vorinkubation mit hBD-2. Für die Versuche wurden HT-29 Zellen in der Zellpassage 27-34 verwendet. Die hBD-2-Gruppe zeigte im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe in der Fluoreszenzmessung erstaunlicherweise jetzt eine Abnahme der Ca^{2+} Antwort sowohl nach Gabe von ATP ($30\mu\text{M}$) als auch nach anschließender Applikation von CCH ($100\mu\text{M}$). Der maximale Spitzenwert des Fluoreszenzquotienten nach Agonisten Gabe erreichte in der Kontrollgruppe für ATP $1,94\pm 0,13$ und in der hBD-2 vorbehandelten Gruppe $1,36\pm 0,09$. CCH führte in der Vehikel-Kontrolle zu einer Peak-Ratio von $1,36\pm 0,105$ im Vergleich zu $1,07\pm 0,05$ in der hBD-2 Gruppe (s. Abb. 21 D). Die Fläche unter der Kurve, dargestellt in Teilabbildung 21 C für ATP und CCH wurde für 180s berechnet. AUC für ATP der hBD-2-

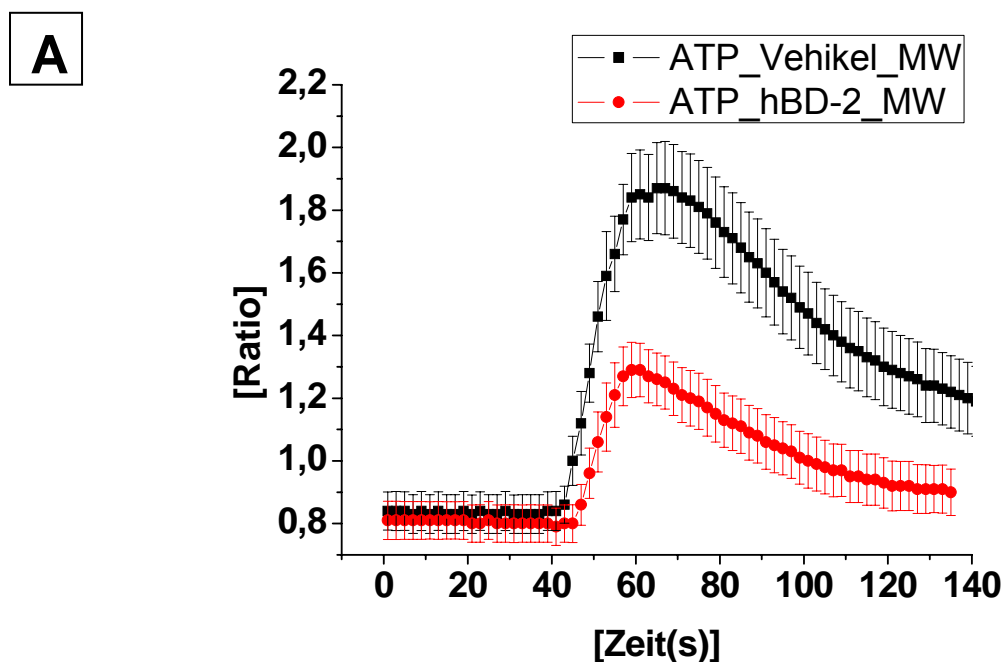


Abbildung 21:

Ergebnisse der Fluoreszenzmessung mit Fura-2 ($5\mu\text{mol/l}$) an HT-29 Zellen, die 24 Stunden mit Vehikel oder hBD-2 ($5\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert wurden.

A: Vergleich der Fluoreszenzquotienten (Ratio) als Mittelwertkurven zwischen Vehikel und hBD-2 durch Stimulation mit ATP ($30\mu\text{mol/l}$).

Gruppe war um 60% erniedrigt von $61,8 \pm 6,37$ in der Vehikel-Kontrollgruppe auf $20,6 \pm 5,27$ (s. Abb. 21 A, C). AUC für CCH war entsprechend für die hBD-2-Gruppe mit $16,5 \pm 3,47$ um 55% erniedrigt im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe ($37,5 \pm 3,95$) (s. Abb. 21 B, C). Somit erniedrigte hBD-2 den durch ATP und CCH ausgelösten Ca^{2+} Transienten nach 24stündiger Vorinkubation.

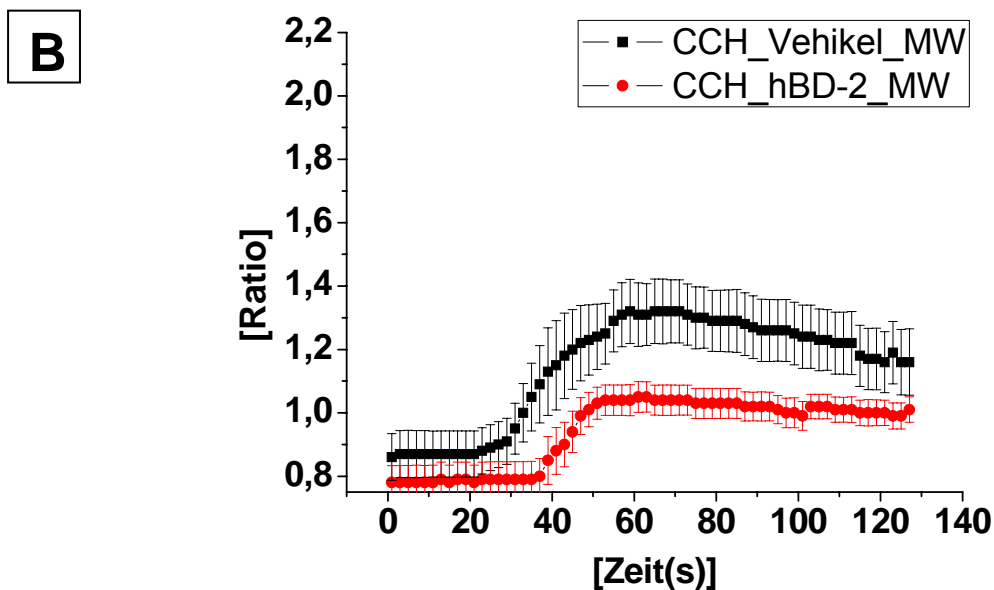


Abbildung 21:

B: Vergleich der Fluoreszenzquotienten (Ratio) als Mittelwertkurven zwischen Vehikel und hBD-2 durch Stimulation mit CCH ($100 \mu\text{mol/l}$).

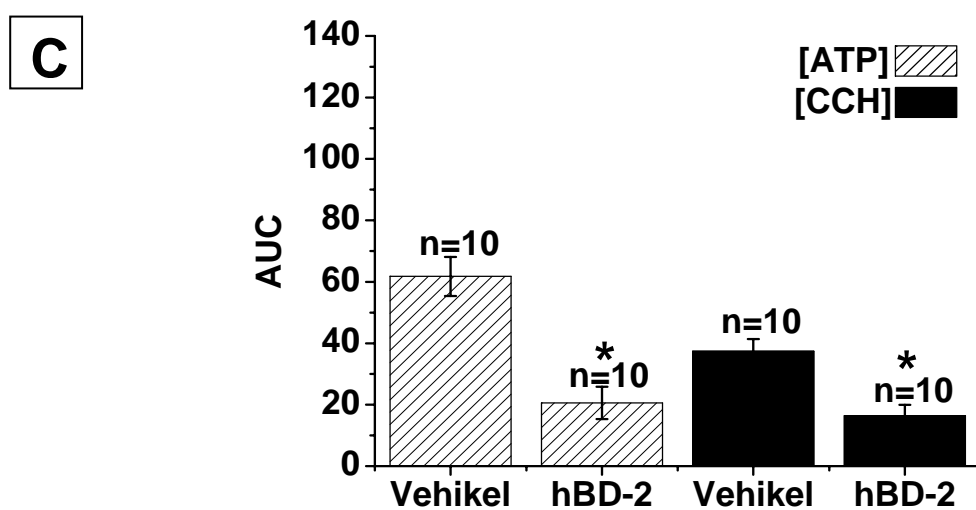


Abbildung 21:

C: Vergleich der Integrale als AUC (AUC: engl. „area under the curve“) nach Stimulation mit ATP und CCH.

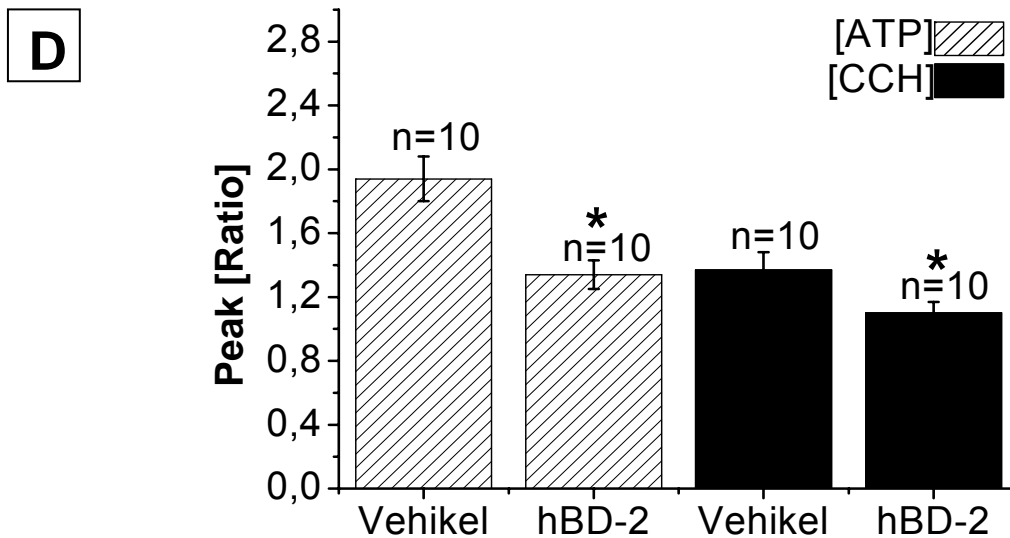


Abbildung 21:

D: Vergleich des höchsten Fluoreszenzquotienten nach Stimulation mit ATP und CCH zwischen Vehikel-Kontrollgruppe und der hBD-2 Gruppe.

3.5 Wirkung von AMPs auf den Ionenleitwert (chronisch)

Analog zur Fluoreszenzmessung (s. 3.4) wurden am gleichen Tag HT-29 Zellen der Zellpassagen 27-34 mit der Ganzzellableitung untersucht. Die Zellen waren mit hBD-2 (5µg/ml) und der entsprechenden Menge Vehikel für 24 Stunden vorinkubiert.

Während des Experimentes wurde zuerst ATP (30µmol/l) und nachfolgend CCH (100µmol/l) appliziert. Der Leitwert (G_m) für ATP der hBD-2-Gruppe war um 51% im Vergleich zur Vehikelgruppe erniedrigt, von $32,8 \pm 7,24$ nS in der Vehikel-Kontrollgruppe auf $16,16 \pm 4,69$ nS in der hBD-2 Gruppe. Für CCH war der korrigierte Gesamtleitwert um 41% in der mit hBD-2 vorbehandelten Gruppe erniedrigt im Vergleich zur Vehikelgruppe von $12,59 \pm 2,41$ nS auf $7,38 \pm 1,1$ nS (s. Abb. 22 A).

Der Oberflächenleitwert als Maß für die Ionenpermeabilität der Zellmembran pro Fläche war für ATP in der hBD-2-Gruppe sogar um 70% reduziert im Vergleich zur Vehikelgruppe von $1,92 \pm 0,69$ nS/pF auf $0,58 \pm 0,16$ nS/pF. Nach Applikation von CCH war die Ionenpermeabilität der hBD-2-Gruppe um 63% erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe von $1,03 \pm 0,35$ nS/pF auf $0,38 \pm 0,08$ nS/pF (s. Abb. 22 B). Somit erniedrigte hBD-2 den durch ATP und CCH ausgelösten Gesamtleitwert und Oberflächenleitwert nach 24stündiger Vorinkubation.

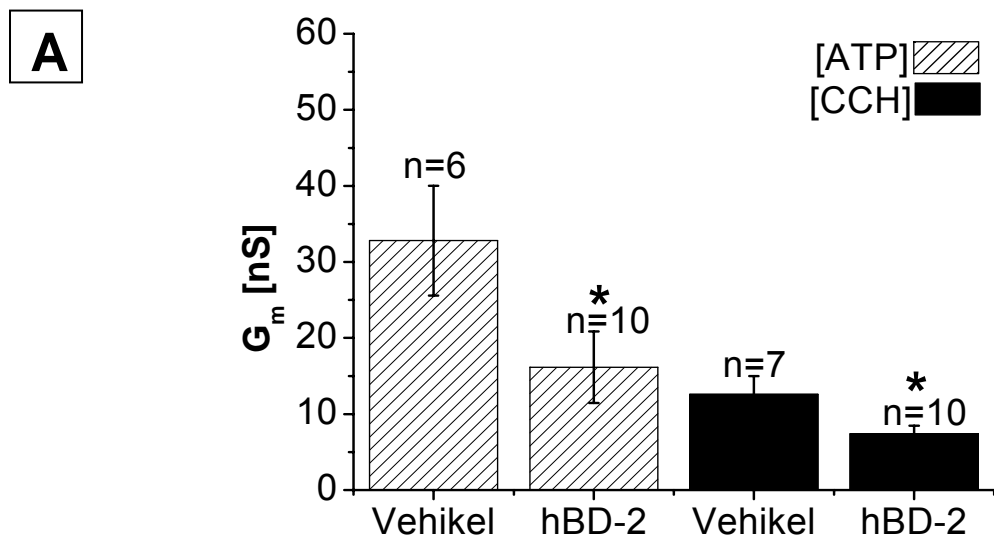


Abbildung 22:

Ergebnisse der Patch-Clamp Untersuchungen an HT-29 Zellen, die 24 Stunden mit Vehikel oder hBD-2 (5 μ g/ml) vorinkubiert und am gleichen Tag der Fluoreszenzmessung gemessen wurden.

A: Korrigierter Gesamtleitwert als Mittelwert, der durch ATP (30 μ mol/l) und CCH (100 μ mol/l) ausgelöst wurde; im Vergleich Vehikel-Kontrollgruppe u. hBD-2Gruppe.

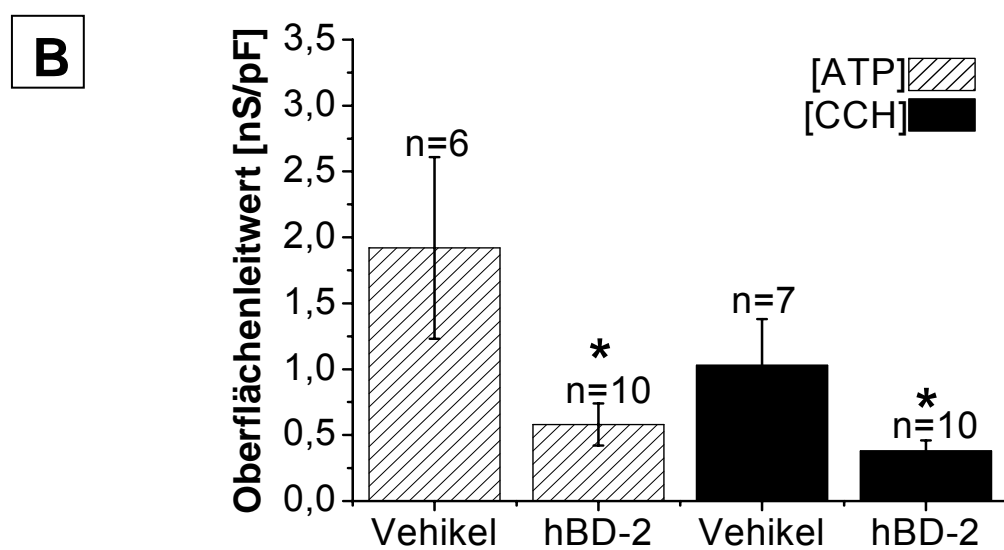


Abbildung 22:

B: Vergleich des Oberflächenleitwertes zwischen Vehikel-Kontrollgruppe und hBD-2 Gruppe.

3.6 hBD-2 Messung im Nährmedium von HT-29 Zellen

Die hBD-2 Konzentrationen wurden mit Hilfe eines ELISAs vor und nach 24h-Inkubation von HT-29 Zellen ermittelt (s. Abb. 23).

Direkt nach Zugabe von 10µg einer Stammlösung von hBD-2 [1mg/1ml] (s. 2.6.3) in ein Schälchen mit 2ml Nährmedium und HT-29 Zellen wurde eine Probe des Überstandes mit einer Endkonzentration von 5µg/ml abgenommen (0h) und später zusammen mit einer Vergleichsprobe, die nach 24h entnommen wurde auf ihren hBD-2 Gehalt hin untersucht.

Im Überstand des nur mit Vehikel behandelten Kontrollversuchs blieb hBD-2 in beiden Proben unter der Nachweisgrenze. In den beiden Proben zum Zeitpunkt 0h und 24h nach hBD-2 Zugaben ließen sich jeweils ähnliche Konzentrationen von $5,16 \pm 0,35 \text{ ng/ml}$ (0h) und $4,17 \pm 0,33 \text{ ng/ml}$ (24h) nachweisen. Offensichtlich wurde bereits initial ein Großteil der eingebrachten hBD-2 Menge in Kulturschälchen gebunden.

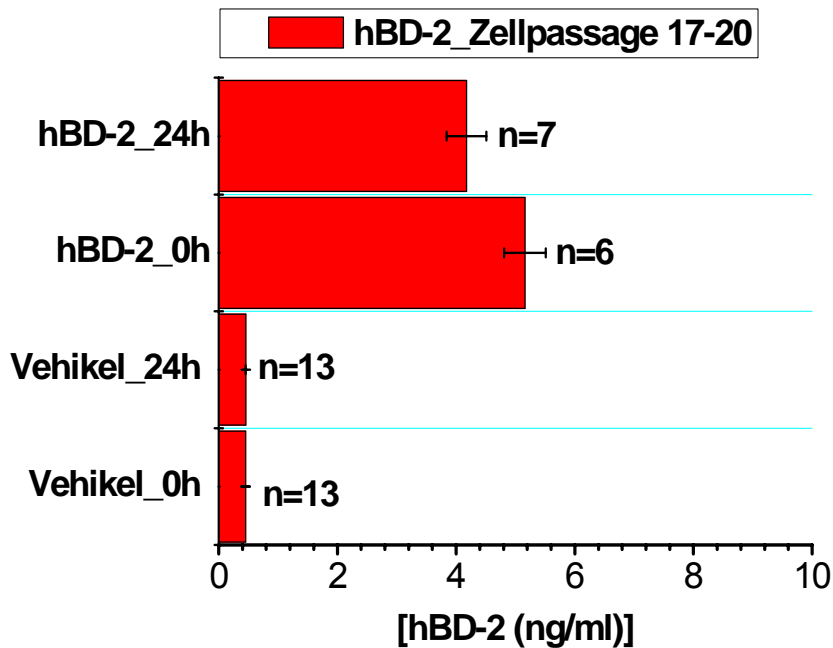


Abbildung 23:

ELISA-Ergebnisse der Messung von hBD-2 im Nährmedium von HT-29 Zellen zu Beginn und am Ende der 24-Stunden-Inkubation mit Vehikel oder hBD-2 (5µg/ml).

3.7 hBD-2 Verdünnungsreihe in McCoy-Nährmedium

Um den Anteil des Kulturmediums und der Kulturschälchen an der Bindung von hBD-2 herauszufinden, wurden in einer Konzentrationsreihe 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 und 20 ng/ml hBD-2 in das McCoy-Nährmedium (s. 2.6.1) hinzupipettiert und mittels hBD-2-ELISA (s. 2.5) analysiert (s. Abb. 24). Ab einer Konzentration von 0,6ng/ml konnte hBD-2 detektiert werden. Die Proben der darüberliegenden Konzentrationen enthielten noch etwa 50% der pipettierten hBD-2 Menge, die im hBD-2-ELISA gemessen wurde.

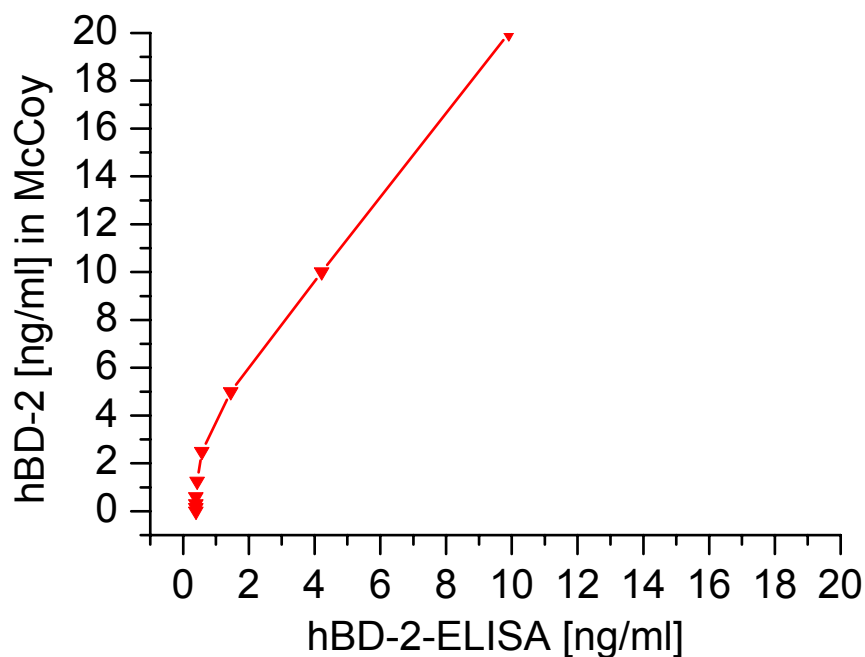


Abbildung 24:

hBD-2-ELISA-Ergebnisse von McCoy-Nährmedium nach Hinzugabe von 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 und 20 ng/ml hBD-2.

4 Diskussion

4.1 Stand der Forschung

Der Schwerpunkt der Daten zu AMPs liegt bisher vorwiegend bei ihrer speziellen Struktur und ihren antimikrobiellen Angriffsmechanismen wie z.B. der Porenbildung (9;45;46). Zusätzlich werden die immunmodulatorischen und zytokinartigen Eigenschaften der AMPs intensiv beforscht (47;48). Über direkte Wirkungen von AMPs auf Epithelzellen ist sehr wenig bekannt. In Übersichtsarbeiten wurde postuliert, dass Defensine den epithelialen Salz- und Wassertransport beeinflussen (49;50). Da viele AMPs bei höheren Salzkonzentrationen gehemmt werden, könnten sie so eine extrazelluläre Ionenzusammensetzung schaffen, in der sie antimikrobielle Aktivität ausbilden können. Die bakteriziden Eigenschaften der AMPs selber machen es zusätzlich nicht unwahrscheinlich, dass auch zytotoxische Effekte auf die Epithelzellen auftreten könnten.

Bis jetzt gibt es jedoch wenige funktionelle Daten zu Rückkopplungsmechanismen bzw. zu Einflüssen von AMPs auf ihre Ursprungsepithelien. Für Maus Cryptidine (α -Defensine) ist beschrieben, dass sie unter Zellkulturbedingungen in der Lage sind Chlorid-Sekretion zu induzieren (51;52). Für fast alle anderen AMPs ist nach wie vor unklar, ob sie über porenbildende, zytotoxische Eigenschaften, spezifische Rezeptoren oder andere Rückkopplungsmechanismen verfügen, um Epithelzellen zu beeinflussen.

In dieser Arbeit zeigen wir zum ersten Mal, dass das Defensin hBD-2 auch in nativen Epithelien in der Lage ist Transporteigenschaften zu modulieren.

4.2 Wirkkonzentration und Speziesunterschiede

Die Einschätzung der tatsächlichen Konzentration von AMPs in Körperflüssigkeiten ist schwierig, da diese Peptide eine besonders starke Neigung zur Bindung an Oberflächen haben. Darüber hinaus sind die Flüssigkeitsräume oft schlecht durchmischt oder es handelt sich um kleinste Volumina wie z.B. Feuchtfilm der Haut, Flüssigkeit in den Krypten der Darmschleimhaut oder die sehr dünne Flüssigkeitsschicht auf dem respiratorischen Flimmerepithel. Konzentrationsangaben in der Literatur beziehen sich vornehmlich (53) auf den antimikrobiellen Einsatz von hBD-2. Wir konnten zeigen, dass Konzentrationen von hBD-2 in dieser Größenordnung ebenfalls für die Modulation von Epithelzellen ausreichend waren ohne direkt zytotoxisch zu sein.

Die Abbildung 25 zeigt eine Übersicht einiger β -Defensine von Mensch, Maus und Ratte im Vergleich zu hBD-2 (54-56). Es gibt keine direkten homologen Defensine zu hBD-2 in Maus und Ratte. Während hBD-1 und hBD-3 nur ca. 35%-40% Homologie aufweisen (reifes Peptid), erreichen mBD-3, rBD-4 und -5 ca. 50%. Maus und Ratte verfügen somit wahrscheinlich über mehrere Defensine mit relativ hoher Homologie zu hBD-2. Aufgrund dieser Überlegungen und der besseren Verfügbarkeit von Nagergewebe haben wir hBD-2 nicht nur an humaner Zellkultur HT-29 getestet, sondern auch an Mastrachea und Rattencolon.

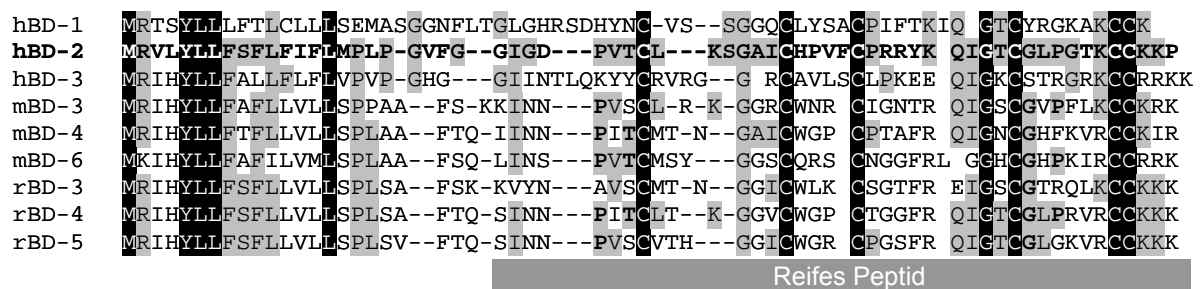


Abbildung 25:

Vergleich der Aminosäuresequenzen der β -Defensine von Mensch, Maus und Ratte.

Konservierte Aminosäuren (AS) sind schwarz hinterlegt; bezogen auf hBD-2 (fett hervorgehoben) sind die homologen AS grau hinterlegt; der Bereich des reifen Peptids ist durch einen grauen Balken gekennzeichnet.

4.3 hBD-2 erhöht die cholinerge Antwort im Colonepithel

In Ussingkammer Experimenten an frisch isoliertem Rattencolon zeigten sich nach direkter Zugabe von hBD-2 keine Effekte. Nach Vorinkubation mit hBD-2 fiel die CCH induzierte Ca^{2+} abhängige Chloridsekretion im Vergleich zur Kontrolle deutlich stärker aus. In den oben bereits erwähnten Arbeiten hingegen induzierten die α -Defensine Cryptidin-2 und Cryptidin-3 in humanen intestinalen T84 Zellen eine Chlorid Sekretion. Die Autoren Lencer et al. und Merlin et al. (51;52) zeigten, dass Cryptidin-3 eine apikale Chloridleitfähigkeit aktivieren könnte, die unabhängig von CFTR war. Beide Studien belegten eine direkte Wirkung der murinen α -Defensine auf die Chloridleitfähigkeit der kultivierten Epithelzellen. Die Wirkungen traten schnell im Zeitraum von wenigen Minuten auf. Im Gegensatz hierzu kam es in unseren Experimenten nicht zu einer direkten Beeinflussung der Cl^- Leitfähigkeit. Vielmehr zeigen unsere Daten zum ersten Mal eine Wirkung von hBD-2 auf die Ca^{2+} abhängige Cl^- Sekretion durch die Verstärkung der Wirkung des cholinergen Agonisten CCH.

Im Intestinaltrakt führt VIP über den cAMP vermittelten Weg zu einer lang anhaltenden Cl⁻ Sekretion (57). Zusätzlich wird die Flüssigkeitssekretion über cholinerge Einflüsse des enterischen Nervensystems (ENS) schnell und kurzfristig angeregt (34;57-59). Dabei gibt es genügend Hinweise aus *in vivo* Experimenten, dass das enterische Nervensystem eine Hauptrolle in der Pathophysiologie der Diarrhoe spielt (57). Die bei einer bakteriellen Infektion des Magen-Darmtraktes auftretenden Durchfälle könnten somit nicht nur durch bakterielle Faktoren (z.B. Endotoxine) bedingt sein, sondern auch durch eine defensin-induzierte Epithelantwort moduliert werden. Die möglicherweise zugrundeliegenden zellulären Mechanismen sind noch weitestgehend unklar und sollen hier im Zusammenhang mit den Ca²⁺ Messungen in HT-29 Zellen diskutiert werden (s. 4.6).

4.4 hBD-2 beeinflusst den elektrogenen Ionentransport im respiratorischen Epithel

Im respiratorischen Epithel beeinflusste hBD-2 den elektrogenen Ionentransport. Die Chloridsekretion wurde in diesem Gewebe nicht untersucht. Sie wurde durch Bumetanid gehemmt (s. Abb. 8). hBD-2 führte zu einer leichten, transienten Erhöhung des I_{sc} um 3,2%. Da der transepitheliale Widerstand parallel dazu abnahm, ist es wahrscheinlich, dass zusätzliche Transportwege unter dem Einfluss von hBD-2 geöffnet wurden.

Als Transportwege kommen hierfür der luminale Na⁺ Kanal ENaC, basolaterale K⁺ Kanäle oder luminale Ca²⁺ Kanäle in Frage. Sowohl die Aktivierung von ENaC als auch die indirekte Steigerung der Na⁺ Resorption über die Erhöhung der K⁺ Kanal-Triebkraft (60;61) hätte eine Verminderung der luminalen Sekretmenge und einen zäheren Bronchialschleim zur Folge. Ob die beobachtete geringe Änderung des I_{sc} durch hBD-2 in dieser Hinsicht bereits funktionell relevant sein könnte, ist fraglich. Vorstellbar wäre auch eine Ca²⁺ Aufnahme unabhängig vom Na⁺ Transport, wofür die diskrete und transiente Zunahme des I_{sc} sprechen könnte. Hinter dem gemessenen elektrophysiologischen Effekt könnte eine Signaltransduktion stehen, die z.B. die ziliäre Schlagfrequenz steigert und so die Pathogenabwehr unterstützt (62).

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, über welche Signaltransduktionswege hBD-2 in den Elektrolyttransport im respiratorischen Epithel eingreift.

4.5 hBD-2 führt in HT-29 Zellen nicht zur Porenbildung

In dieser Arbeit wurden weiterhin zum ersten Mal mögliche porenbildende Eigenschaften von hBD-2 an HT-29 Zellen und Colongewebe untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass AMPs in Lipiddoppelschichten Poren bilden können, die für Ionen permeabel sind (63). Zur

Überprüfung der Porenbildung in Epithelzellmembranen verwendeten wir die Messung der membranpotenziale und Leitwerte mit der Patch-Clamp Technik bzw. die Ussingkammer Messung am nativen Colonepithel. Sowohl HT-29 Zellen als auch natives Colonepithel verfügen über Membranleitwerte, die direkt über die intrazelluläre Ca^{2+} Aktivität gesteuert werden. Dementsprechend würde sich ein Ca^{2+} Einstrom über Poren in einer Änderung der Messparameter durch die Aktivierung von Ionenkanälen abbilden.

Unsere Daten zeigten keinen akuten Effekt von hBD-2 während der Patch-Clamp Messung an HT-29 Zellen und an nativem Colonepithel, was gegen die effektive Bildung von ionenleitenden Poren spricht. Über purinerge Stimuli mittels ATP wurde im Verlauf der Experimente die Integrität der HT-29 Zellen überprüft, die daraufhin mit einer Erhöhung des Ca^{2+} abhängigen Cl^- Leitwertes antworteten (39). Im nativen Gewebe wirkter der Ca^{2+} Agonist Carbachol. In den verwendeten Konzentrationen war hBD-2 nicht zytotoxisch.

4.6 hBD-2 erhöht die cholinerge Ca^{2+} Antwort in HT-29 Zellen nach 20min Vorinkubation

Weiterhin demonstrierten wir zum ersten Mal die spezifische Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Antwort von hBD-2 auf HT-29 Zellen nach 20min Vorinkubation. Dieses Ergebnis unterstützte die Messungen der cholinergen Antwort im Colonepithel. Folgende Mechanismen könnten dafür verantwortlich sein:

- 1) hBD-2 bildet einen Ca^{2+} durchlässigen Kanal. Dagegen spricht, dass wir innerhalb der Patch-Clamp Untersuchung keine Leitwerterhöhung durch hBD-2 gemessen haben (s. 4.3).
- 2) hBD-2 bindet an einen spezifischen Rezeptor, der zumindest indirekt in die Ca^{2+} Signaltransduktion eingreift. Wenn vorhanden ist dieser Rezeptor nicht Ca^{2+} gekoppelt, weil während der hBD-2 Gabe kein Ca^{2+} Transient auftrat. Zum Beispiel könnte der Rezeptor an ein anderes *Second Messenger* – System gekoppelt sein. Denkbar wäre auch eine Modifizierung des M3-Rezeptors.
- 3) Der M3 Rezeptor gehört zu den Gq-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Signaltransduktion erfolgt über IP_3 -Bildung durch die Phospholipase- $\text{C}\beta$ und PIP_2 , ein membrangebundener Prozess. Man könnte spekulieren, dass sich während der 20min Vorinkubation hBD-2 in die Lipiddoppelschicht einlagert und zur Aktivierung von ortständigen Lipiden führen könnte. Zum Beispiel das Lysophosphatidylcholin (LPC) aktiviert G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. hBD-2 könnte die Freisetzung von LPC auslösen und dadurch die o.g. intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen (64).

- 4) Denkbar wäre auch, dass hBD-2 die Plasmamembran durchquert und sich anschließend in Membranen von intrazellulären Kompartimenten einlagert. Mitochondrien verfügen aufgrund ihres bakteriellen Ursprungs über eine Lipidzusammensetzung, die die Bindung von hBD-2 erleichtert und dienen zusätzlich als Ca^{2+} Speicher.

Im Vergleich zu hBD-2 untersuchten wir gleichzeitig das konstitutiv exprimierte hBD-1, das induzierbare hBD-3 und das α -Defensin HD-5. Keines der verglichenen Defensine wies eine Veränderung der CCH Antwort auf. Dies spricht gegen alle Hypothesen, die auf einer unspezifischen Membraninteraktion beruhen. Im Vergleich zu den Aminosäuresequenzen der humanen Defensinen hBD-1 und hBD-3 (s. Abb. 25), ist hBD-2 als reifes Peptid prolinreicher. Auch in den höher homologen Maus- und Ratten Defensinen sind diese Proline konserviert. Dieser spezifische Unterschied der Aminosäuresequenz von hBD-2 könnte eine spezielle Membraninteraktionen oder Rezeptorbindung ermöglichen (65).

4.7 Langzeiteffekt von hBD-2 auf HT-29 Zellen

Des Weiteren konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass es nach chronischer Langzeitstimulation mit hBD-2 für 24h an HT-29 Zellen zu einer Abschwächung der Ca^{2+} Antwort kam. Der Ca^{2+} Transient war im Vergleich zu Kontrollbedingungen nicht nur nach cholinergem Stimulation mit CCH um 55% erniedrigt, sondern auch nach purinergem Stimulation mit ATP um 60% erniedrigt. Patch-Clamp Messungen unterstützen die Ca^{2+} Messungen und zeigten entsprechende Daten für den Gesamtleitwert und den Oberflächenleitwert der HT-29 Zellen nach Langzeitstimulation mit hBD-2 (s. 3.5).

Diese Abschwächung der Ca^{2+} Antwort nach Langzeitinkubation könnte darauf basieren, dass eine kontinuierliche Langzeitstimulation mit hBD-2 zur Internalisierung von Rezeptoren führt. Die akute Exposition mit hBD-2 würde in diesem Fall wie oben beschrieben die Steigerung der sekretorischen Eigenschaften der Zelle bedingen, während die chronische Exposition ihrerseits die Sekretion reduzieren würde. Diese zeitabhängige Regulation könnte einen Schutzmechanismus darstellen, um den Organismus vor einer überschießenden Reaktion zu bewahren.

Zudem konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die HT-29 Zellen während der Langzeitstimulation mit hBD-2 kein zusätzliches hBD-2 sezernieren (s. 3.6).

4.8 Wirkkonzentration von hBD-2

Im Rahmen der 24h-Inkubation sollte zur Verlaufskontrolle die Konzentration von hBD-2 vor und nach Inkubation mit Hilfe eines ELISAs bestimmt werden, um festzustellen, ob die untersuchten HT-29 Zellen hBD-2 eventuell verbrauchen oder zusätzlich hBD-2 sezernieren können. Dabei stellte sich heraus, dass HT-29 weder hBD-2 sezernieren noch verbrauchen. Die gemessene Eingangskonzentration von hBD-2 war jedoch mit 50% deutlich niedriger als nach Zugabe eigentlich zu erwarten gewesen wäre. Ein Grund für den Verlust von freiem hBD-2 stellt hierbei höchstwahrscheinlich die hohe kationische Aktivität des AMPs dar, mit hoher Affinität zu negativen Oberflächen. Ein Teil des Peptids bleibt möglicherweise an den Oberflächen von Reaktionsgefäßen, Kulturschalen und Pipettenspitzen haften.

Auf der Suche nach der tatsächlichen wirksamen Konzentration von hBD-2 konnten wir feststellen, dass wahrscheinlich 99,9% des freien hBD-2 an Zellkulturen und Geweben binden (s. 3.6). Aufgrund der von uns gemessenen Effekte auf Epithelzellen in Zusammenhang mit dem beschriebenen Phänomen des Peptidverlusts ist jedoch davon auszugehen, dass bereits deutlich niedrigere Konzentrationen von hBD-2 wirksam sind. Dabei ist für die physiologische Funktion nicht die in freier Lösung messbare Konzentration relevant, sondern die auch auf den Zellen sich niederschlagende Stoffmenge bzw. Dosis.

4.9 Ausblick und Schlussfolgerungen

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass das hier exemplarisch untersuchte Defensin hBD-2 in der Lage ist, seine „Mutterzellen“, also die hBD-2 bildenden Epithelzellen, zu beeinflussen. Wir untersuchten den Rückkopplungsmechanismus von hBD-2 auf Epithelien, teilweise im Vergleich mit hBD-1,-3 und HD-5. Dabei fanden wir heraus, dass hBD-2 gegenüber den anderen Defensinen sehr wohl spezifische Effekte aufweist. Speziell konnten wir zeigen, dass hBD-2 in die intrazelluläre Ca^{2+} Homöostase eingreift und diese kurzfristig und langfristig beeinflussen kann. Welche intrazellulären Mechanismen bzw. Zielstrukturen hBD-2 hierbei verändert und welche Ca^{2+} speichernden Kompartimente dabei eine Rolle spielen könnten, wollen wir in zukünftigen Arbeiten untersuchen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen eine Grundlage dar, den Einfluss von AMPs auf Epithelien zu verstehen. Aus den so gewonnenen Erkenntnissen können sich neue Impulse für die Erforschung der Pathophysiologie von Durchfallerkrankungen ergeben. Bei akuten, bakteriellen Diarrhöen könnte hBD-2 hierbei über den in dieser Arbeit dargelegten sekretionsfördernden Mechanismus die schnelle Überwindung der Infektion unterstützen. Auf

der anderen Seite könnte eine inadäquate Regulation der hBD-2 Expression eine zumindestens beeinflussende Rolle bei der Genese und Aufrechterhaltung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen.

5 Zusammenfassung

Epithelien spielen eine wichtige Rolle im Elektrolyttransport und bei der Homöostase des Salz-Wasser-Haushaltes. Neben dieser Aufgabe sind Epithelien Teil der ersten Verteidigungslinie des Immunsystems und sezernieren antimikrobielle Peptide (AMPs). Einige AMPs werden konstitutiv exprimiert, andere werden erst durch pro-inflammatorische Zytokine oder bakterielle Produkte induziert. Mit dieser Arbeit wird die Hypothese unterstützt, dass AMPs die epitheliale Funktion in Form eines Rückkopplungsmechanismus beeinflussen können und damit die intrazelluläre Signaltransduktion bzw. die luminale Elektrolytsekretion verändern. Die Wirkung des humanen β -Defensin-2 (hBD-2) wurde an frisch präpariertem Colongewebe der Wistar-Ratte und respiratorischem Gewebe der C57Bl6-Maus mit der Ussingkammer Technik untersucht. Die akute Gabe von hBD-2 hatte im Colon keinen Einfluss auf die cAMP abhängige Chloridsekretion, verstärkte jedoch die cholinerg induzierte Ca^{2+} abhängigen Chloridsekretion nach 20min Inkubation um ca. 40%. In der Trachea wurde nur eine minimale Zunahme des Kurzschlussstromes I_{sc} beobachtet. Weitere Untersuchungen wurden an humanen Colocarcinomzellen HT-29 durchgeführt. In Ganzzelleableitung mit der Patch-Clamp Methode zeigten sich keine unmittelbaren, durch hBD-2 verursachten Veränderungen in der Membranleitfähigkeit. In Fluoreszenzmessungen mit Fura-2 führten 20min Inkubation mit hBD-2 zu einer Erhöhung des durch CCH induzierten Ca^{2+} Transienten um ca. 25%. Dagegen führte die Inkubation der HT-29 Zellen mit hBD-2 über 24h erstaunlicherweise zu einem um ca. 50% reduzierten Ca^{2+} Transienten. Abschließend zeigen die Ergebnisse aus unabhängigen *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen eine Beeinflussung der Ca^{2+} Signalkaskade durch hBD-2 in Colonepithelzellen. Über diese Rückwirkung auf Epithelzellen kann hBD-2 möglicherweise eine Rolle in der Pathophysiologie von Durchfallerkrankungen spielen. In jedem Fall zeigen die Daten einen neuen Mechanismus, über den sich sezernierte AMPs über die Modulation der Elektrolytsekretion auf die Zusammensetzung der luminalen Flüssigkeit auswirken.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999 May 21;284(5418):1313-1318.
- (2) Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000 Aug 3;343(5):338-344.
- (3) Schroder JM. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 1999 Oct 1;56(1-2):32-46.
- (4) Hirsch JG. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1956 May 1;103(5):589-611.
- (5) Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005 Mar;3(3):238-250.
- (6) Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002 Jan 24;415(6870):389-395.
- (7) Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005 Mar;21(2):147-151.
- (8) Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 2002 Dec;110(6):823-831.
- (9) Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001 Feb 23;276(8):5707-5713.
- (10) Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, et al. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000 Jun;22(6):714-721.
- (11) Hase K, Eckmann L, Leopard JD, Varki N, Kagnoff MF. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect Immun* 2002 Feb;70(2):953-963.
- (12) Hase K, Murakami M, Imura M, et al. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2003 Dec;125(6):1613-1625.
- (13) Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* 1994 Sep;3(9):1362-1373.
- (14) Gudmundsson GH, Agerberth B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J Immunol Methods* 1999 Dec 17;232(1-2):45-54.

-
- (15) Scott MG, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol* 2000;20(5):407-431.
 - (16) Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 2004;22:181-215.
 - (17) Lin PW, Simon PO, Jr., Gewirtz AT, et al. Paneth cell cryptdins act in vitro as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response. *J Biol Chem* 2004 May 7;279(19):19902-19907.
 - (18) Kagan BL, Ganz T, Lehrer RI. Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* 1994 Feb 28;87(1-3):131-149.
 - (19) Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 2002 Feb;14(1):96-102.
 - (20) Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* 2004 Jun;327(6):539-549.
 - (21) Ouellette AJ, Bevins CL. Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2001 Feb;7(1):43-50.
 - (22) Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995 Jul 17;368(2):331-335.
 - (23) Garcia JR, Krause A, Schulz S, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001 Aug;15(10):1819-1821.
 - (24) Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin
1. *Nature* 1997 Jun 26;387(6636):861.
 - (25) Schroder JM, Harder J. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 1999 Jun;31(6):645-651.
 - (26) Bals R, Wang X, Wu Z, et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998 Sep 1;102(5):874-880.
 - (27) Singh PK, Jia HP, Wiles K, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Dec 8;95(25):14961-14966.
 - (28) Tomita T, Hitomi S, Nagase T, et al. Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol Immunol* 2000;44(9):749-754.
 - (29) Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, et al. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 2001 Feb;12(1):3-10.
 - (30) O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium
5. *J Immunol* 1999 Dec 15;163(12):6718-6724.

-
- (31) Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease
12. *Physiol Rev* 2002 Jan;82(1):245-289.
- (32) Geibel JP. Secretion and absorption by colonic crypts
1. *Annu Rev Physiol* 2005;67:471-490.
- (33) Greger R, Mall M, Bleich M, et al. Regulation of epithelial ion channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
9. *J Mol Med* 1996 Sep;74(9):527-534.
- (34) Barrett KE, Keely SJ. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects
21. *Annu Rev Physiol* 2000;62:535-572.
- (35) Schulz-Baldes A, Berger S, Grahammer F, et al. Induction of the epithelial Na⁺ channel via glucocorticoids in mineralocorticoid receptor knockout mice. *Pflugers Arch* 2001 Nov;443(2):297-305.
- (36) Ballard ST, Spadafora D. Fluid secretion by submucosal glands of the tracheobronchial airways. *Respir Physiol Neurobiol* 2007 Dec 15;159(3):271-277.
- (37) Charfi MR, Zbiba M, Belaljia MS, Lockhart A. [Ion transports across the respiratory epithelium]
1. *Rev Pneumol Clin* 1997;53(2):71-78.
- (38) Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986 Sep;68(9):1035-1040.
- (39) Hayslett JP, Gogelein H, Kunzelmann K, Greger R. Characteristics of apical chloride channels in human colon cells (HT29)
2. *Pflugers Arch* 1987 Nov;410(4-5):487-494.
- (40) Sahly H, Schubert S, Harder J, et al. Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3
3. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 May;47(5):1739-1741.
- (41) Ussing HH. The frog skin potential. *J Gen Physiol* 1960 May;43:135-147.
- (42) Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976 Apr 29;260(5554):799-802.
- (43) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981 Aug;391(2):85-100.
- (44) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985 Mar 25;260(6):3440-3450.

-
- (45) Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity
2. *Nat Rev Immunol* 2003 Sep;3(9):710-720.
- (46) Morgera F, Antcheva N, Pacor S, et al. Structuring and interactions of human beta-defensins 2 and 3 with model membranes
1. *J Pept Sci* 2008 Apr;14(4):518-523.
- (47) Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal
2. *Trends Immunol* 2002 Jun;23(6):291-296.
- (48) Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2
1. *Science* 2002 Nov 1;298(5595):1025-1029.
- (49) Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 2007 Apr;19(2):70-83.
- (50) Kourie JJ, Shorthouse AA. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 Jun;278(6):C1063-C1087.
- (51) Lencer WI, Cheung G, Strohmeier GR, et al. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Aug 5;94(16):8585-8589.
- (52) Merlin D, Yue G, Lencer WI, Selsted ME, Madara JL. Cryptdin-3 induces novel apical conductance(s) in Cl⁻ secretory, including cystic fibrosis, epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Feb;280(2):C296-C302.
- (53) Schroder JM, Harder J. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 1999 Jun;31(6):645-651.
- (54) Bals R, Wang X, Meegalla RL, et al. Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs
2. *Infect Immun* 1999 Jul;67(7):3542-3547.
- (55) Morrison GM, Semple CA, Kilanowski FM, Hill RE, Dorin JR. Signal sequence conservation and mature peptide divergence within subgroups of the murine beta-defensin gene family. *Mol Biol Evol* 2003 Mar;20(3):460-470.
- (56) Patil AA, Cai Y, Sang Y, Blecha F, Zhang G. Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract
1. *Physiol Genomics* 2005 Sep 21;23(1):5-17.
- (57) Field M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea
1. *J Clin Invest* 2003 Apr;111(7):931-943.
- (58) Matthews JB. Molecular regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) and epithelial chloride secretion. *World J Surg* 2002 Jul;26(7):826-830.

-
- (59) Reynolds A, Parris A, Evans LA, et al. Dynamic and differential regulation of NKCC1 by calcium and cAMP in the native human colonic epithelium. *J Physiol* 2007 Jul 15;582(Pt 2):507-524.
- (60) Grahammer F, Warth R, Barhanin J, Bleich M, Hug MJ. The small conductance K⁺ channel, KCNQ1: expression, function, and subunit composition in murine trachea 3. *J Biol Chem* 2001 Nov 9;276(45):42268-42275.
- (61) Hwang T, Suh D, Bae H, Lee S, Jung J. Characterization of K⁺ channels in the basolateral membrane of rat tracheal epithelia. *J Membr Biol* 1996 Dec;154(3):251-257.
- (62) Lorenzo IM, Liedtke W, Sanderson MJ, Valverde MA. TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Aug 26;105(34):12611-12616.
- (63) Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jan;87(1):210-214.
- (64) Eyster KM. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist 10. *Adv Physiol Educ* 2007 Mar;31(1):5-16.
- (65) Suresh A, Verma C. Modelling study of dimerization in mammalian defensins 2. *BMC Bioinformatics* 2006;7 Suppl 5:S17.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Zu Beginn gehört mein größter, tiefster und herzlichster Dank meinen Eltern, die mich nicht nur materiell und seelisch unterstützt haben.

Weiterhin danke ich besonders meinen Doktoreltern Herrn Prof. Dr. med. M. Bleich und Frau Dr. med. N. Himmerkus für ihre zeitintensive Betreuung, motivierende Haltung, helfenden Hände und ihre Offenheit für Diskussionen und Gespräche.

Für die Überlassung des Themas, der Bereitstellung jeglicher Materialien und des Arbeitsplatzes danke ich erneut Herrn Prof. Dr. med. M. Bleich und Herrn PD Dr. rer. nat. J. Harder.

Meine Dankbarkeit gilt auch allen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes der CAU/ Kiel. Hervorheben möchte ich Frau K. Kronenbitter, Herr M. Müller, Herr T. Stegmann, Herr Dr. rer. nat. H. Wiese, Frau Neumann, Frau Tallone, Herr Ohm und Herr C. Richter.

Ich danke Herrn PD Dr. med. G. Gronow, Herrn Prof. Dr. med. J. Kutzt-Buschbeck, Herrn Prof. Dr. med. B. Tillmann, Birte Sievers und Kerstin Suffrian für ihre mentale Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich den Lehrern und Lehrerinnen danken, die ich wertschätze und die mir zum Vorbild geworden sind:

Herr H. Deues, Herr R. Lammering, Herr D. Möbert, Herr H. Kremer, Herr Adler, Herr Hecht, Herr Meiners, Herr Klopffleisch, Mr. Caldwell, Herr Laufkötter, Frau G. Baumgardt, Frau B. Schäfer, Herr B. Kappel-Kantus, Herr U. Holstermann, Herr C. Althoff, Frau I. Holla-Dettmer und Herr Dr. med. A. Linkermann.

7.2 Lebenslauf

Veit Manfred Vaßen

28. September 1977 geboren in Mönchengladbach
 Eltern: Günter Hubert Vaßen,
 ehemaliger Hydraulikfachwart, Rentner
 Marlene Vaßen, geborene Hilgers,
 ehemalige Altenpflegerin, verstorben 2001

Schulische und berufliche Ausbildung

1984 - 1988 römisch katholische Grundschule/ Mönchengladbach-Bettrath
 1988 - 1998 Math.-Nat. Gymnasium/ Mönchengladbach
 1994 - 1995 Concord High School Elkhart, Indiana/ USA
 1999 - 2002 Dörthe-Krause-Institut/ Herdecke
 Sommersemester 2003 Institut für Biologie und Medizin/ Köln

Zertifikate und Abschlüsse

09.06.1995 Certificate of Attendance Concord High School/ USA
 06.08.1998 Abitur Math.-Nat. Gymnasium/ Mönchengladbach
 11.09.2002 Staatsexamen Krankenpflege Dörthe-Krause-Institut/ Herdecke
 25.07.2003 Zertifikat Institut für Biologie und Medizin/ Köln

Grundwehrdienst und Anschlusswehrübung

01.07.1998 - 30.04.1999 Sanitärer Standortsanitätszentrum/ Düsseldorf
 01.05.1999 - 30.06.1999 Hauptgefreiter Standortsanitätszentrum/ Düsseldorf

Berufliche Tätigkeit als Krankenpfleger

01.10.2002 - 30.04.2003 Manor Nursing Home Taunton, Somerset/ Great Britain

Studium

Wintersemester 2003/04 Beginn des Medizinstudiums an der
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 13.09.2005 1. Staatsexamen in Kiel
 11.11.2009 2. Staatsexamen in Kiel
 SS 2008 u. 2009 Tutor des physiologischen Praktikums *Membranpotenzial* für
 Studierende der Vorklinik der CAU/ Kiel
 Wintersemester 2008/09 Dozent für Physiologie an der Physiotherapieschule der
 Akademie Damp GmbH

Promotion

Benotung: magna cum laude
15.02.2006 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. med. M. Bleich
Physiologisches Institut der CAU/ Kiel
20.01.2010 Promotionskolloquium

Praktika, Famulaturen und Praktisches Jahr

15.07.1999 - 15.09.1999 Pflegepraktikum Chirurgie
Filderklinik/ Filderstadt
Chefarzt: PD Dr. med. F. Glaser
09.02.2007 - 11.03.2007 Famulatur Innere Medizin
Evangelisches Krankenhaus Bethesda/ Mönchengladbach
Chefarzt: PD Dr. med. J. Grossmann
23.07.2007 - 21.08.2007 Famulatur Internistische Aufnahmestation
Städtisches Krankenhaus/ Kiel
Chefarzt: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba
17.09.2007 - 21.10.2007 Famulatur Chirurgie
Gemeinschaftskrankenhaus/ Herdecke
Chefarzt: PD Dr. med. F. Glaser
18.02.2008 - 16.03.2008 Famulatur Radiologie
Radiologische Gemeinschaftspraxis/ Mönchengladbach
Dres. Helmut Quack
25.08.2008 - 14.12.2008 1. Terial/ Praktisches Jahr Chirurgie UKSH/ Kiel
15.12.2008 - 05.04.2009 2. Terial/ Praktisches Jahr Innere Medizin UKSH/ Kiel
06.04.2009 - 26.07.2009 3. Terial/ Praktisches Jahr Radiologie Diako/ Flensburg

Berufliche Tätigkeit als Arzt

01.12.2009 - Assistenzarzt Radiologie Diako/ Flensburg
Chefarzt: Prof. Dr. med. Müller-Hülsbeck

Kontakt

eMail veit.vassen@gmx.net

7.3 Veröffentlichung

Aus dieser Arbeit ist folgender Kongressbeitrag und Veröffentlichung hervorgegangen:

V. Vaßen, B. Sievers, N. Himmerkus, J. Harder, M. Bleich

Antimicrobial peptides and epithelial function

Acta Physiologica

Volume 189, Supplement 653, March 2007, P11-L1-13 (Abstract)

Himmerkus, Nina; Vassen, Veit; Sievers, Birte; Goerke, Boeren; Shan, Qixian; Harder, Jürgen; Schröder, Jens-Michael; Bleich, Markus

Human β -defensin 2 increases cholinergic response in colon epithelium

Pflugers Archiv - European Journal of Physiology

Manuscript No. EJP-00220-2009.R2

7.4 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. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Kiel, den 20.01.2010

Veit Vaßen