

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

**IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS  
DER HUMANEN BETA-DEFENSINE -1, -2, -3  
IN NASEN- UND OHRKNORPELGEWEBE DES MENSCHEN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**MARTIN HOPFENZIZ-SÖTH**

aus **Siegen**

Kiel **2010**

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. Warnke, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kurz, Anatomisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.02.2010

gez.: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

Für meine Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Antimikrobielle Peptide	1
1.2	Anatomische Grundlagen des Nasen- und Ohrknorpels	7
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1	Knorpelpräparate post mortem und intra operationem	10
2.2	Einbettung und Schneiden	10
2.3	Immunhistochemischer Defensinnachweis	11
2.3.1	Vorbereitung der Materialien	12
2.3.2	Vorbereitung der Reagenzien	13
2.3.3	Die Entparaffinisierung	15
2.3.4	Die Färbung der Schnitte	15
2.3.5	Hämatoxin- Gegenfärbung und Eindeckeln der Präparate	17
2.4	Semiquantitative Analyse der Immunfärbung	18
2.5	Grafische Auswertung	19
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
	Teil 1 und Teil 2 Übersicht	
3.1	Nasenknorpel post mortem entnommen	22
3.2	Ohrknorpel post mortem entnommen	26
3.3	Nasenknorpel intra operationem entnommen	30
3.4	Ohrknorpel intra operationem entnommen	32
3.5	Semiquantitative Analyse der Immunreaktion	34
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>48</b>
7.1	Publikation	48
7.2	Votum der Ethik-Kommission	49
7.3	Danksagungen	50
7.4	Selbständigkeitserklärung	51
7.5	Lebenslauf	52



# 1 Einleitung

## 1.1 Antimikrobielle Peptide

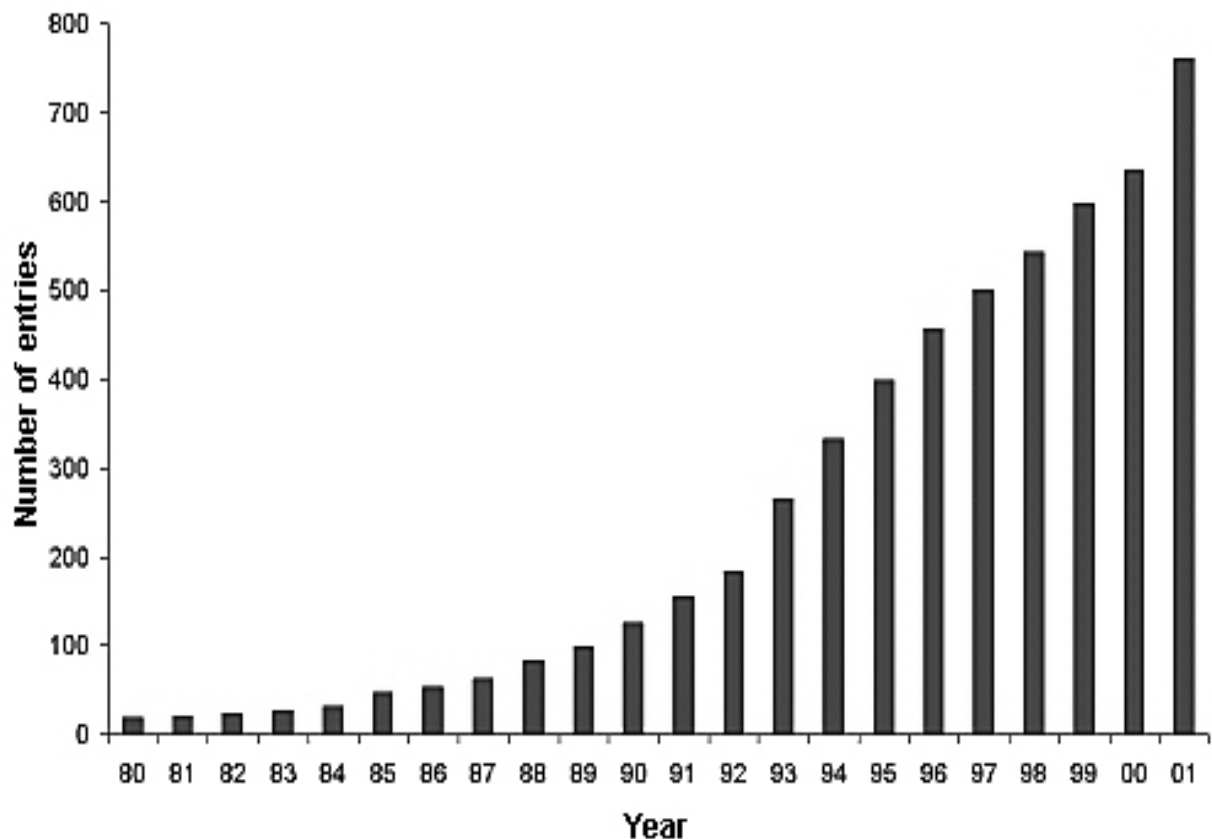
Antimikrobielle Peptide sind Eiweißmoleküle, die von höheren Lebewesen selbst produziert werden. Sie besitzen antibakterielle Eigenschaften und bieten somit einen Schutz vor Infektionen auf zellfreier Basis, ähnlich den ursprünglich von Pilzen hergestellten Antibiotika.

Diese Antibiotika stellen seit den 1940er Jahren eine der stärksten Waffen gegen bakterielle Infektionen dar. Ein zunehmendes Problem sind allerdings auftretende Resistenzen bei bakteriellen Erregern. So haben die übertriebene Anwendung von Antibiotika in der Tierzucht und deren falsche Anwendung beim Menschen dazu geführt, dass sie bei bestimmten Bakterienstämmen ihre Wirkung verlieren (Levy 1998). Ein Beispiel dafür sind die Penicillin- und Methicillin-resistenten Formen von *Staphylokokkus aureus* (MRSA) (Hooton et Levy 2001).

Bedingt durch die Suche nach neuen Waffen gegen bakterielle Infektionen ist das Phänomen der zellfreien angeborenen Immunität auf Basis antimikrobieller Peptide ein seit vier Jahrzehnten erforschtes Gebiet mit hoher klinischer Relevanz.

1972 beschrieben H.G. Boman, I. Nilsson und B. Rasmuson erstmals ein bisher unbekanntes zellunabhängiges Immunsystem an der *Drosophila*-Fliege. Da viele Insekten sich häufig auf bakteriell dicht besiedelten Arealen aufhalten aber kein adaptives auf Lymphozyten basierendes Immunsystem besitzen, war es von Interesse, deren Fähigkeiten bei der Immunabwehr zu untersuchen. Es war dem Team um Boman gelungen, nach vorheriger Impfung der Fliegen mit einem ungefährlichen Bakterium diese einer normalerweise tödlichen Dosis *Pseudomonas aeruginosa* auszusetzen. Die Bakterien konnten den Insekten nichts anhaben. Das Phänomen konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht genauer kategorisiert werden (Boman et al. 1972). Die Untersuchungen wurden bei der Motte *Hyalophora cecropia* fortgesetzt. Es konnte eine Genaktivierung in den Puppen der Insekten nachgewiesen werden, welche die Produktion von antimikrobiellen Peptiden auslöst. 1980 wurden neben dem bereits bekannten Lysozym erstmals zwei antimikrobielle Peptide aus der Motte *Hyalophora cecropia* isoliert und Cecropine genannt (Hultmark et al. 1980). Es folgten im Laufe der nächsten Jahre Studien über neue Moleküle in

Pflanzen (Fernandez de Caley et al. 1972), Insekten (Boman et Hultmark 1987, Boman et al. 1991), Amphibien (Zasloff 1987) und Säugern (Yang et al. 2002). Bis 2004 waren in Trieste in Italien über 800 antimikrobielle Peptide bekannt, die in einer internationalen Datenbank kategorisiert wurden (Abb. 1, [www.bbcm.units.it/~tossi/pag5.htm](http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag5.htm)).



**Abb. 1:** Anzahl der Neueinträge antimikrobieller Peptide in Tieren und Pflanzen ([www.bbcm.units.it/~tossi/pag5.htm](http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag5.htm))

Zudem existieren zahlreiche wissenschaftliche Rückblicke, die den aktuellen Forschungsstand zusammenfassen (Boman et al. 1998, Merrifield et al. 1994, Selsted et Quellette 2005, Harder et al. 2007). Nach einer aktuellen Veröffentlichung von Wang et al. 2008 wies die Antimicrobial Peptide Database des Nebraska Medical Center in Omaha, USA, im Oktober 2008 1228 Einträge antimikrobieller Peptide auf.

Zu für den Menschen bedeutsamen antimikrobiellen Peptiden gehören die Cathelicidine und die Defensine (Boman 2003). Das Cathelicidin LL-37 wurde aus Keratinozyten entzündeter Haut isoliert und ist das bisher einzige beim Menschen



nachgewiesene Cathelicidin (Frohm et al. 1997, Heilborn et al. 2003, Zanetti et al. 1995). Es besitzt eine breite antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Außerdem ist es in der Lage, die Gefäßneubildung anzuregen (Koczulla et al. 2003).

Die Defensine wurden ursprünglich in den Lungen-Makrophagen von Kaninchen entdeckt (Selsted et al. 1983). Die Gruppe der Defensine wird eingeteilt in Alpha-, Beta-, und Theta-Defensine. Alle Defensine gleichen sich in ihrem Aufbau. Sie sind zysteinreiche, relativ kleine kationische Moleküle aus 18-45 Aminosäuren, die durch drei Disulfidbindungen zu einer dreidimensionalen Beta-Faltblatt-Struktur zusammengesetzt sind (Hoover et al. 2001).

Beim Menschen sind sechs Alpha-Defensine bekannt. Diese werden untergliedert in humane neutrophile Peptide (HNP-1, -2, -3, -4), welche sich beim Menschen in erster Linie in den neutrophilen Granulozyten des Blutes befinden, sowie in die humanen Defensin Peptide (HD-5, -6), welche in den Paneth-Zellen des Dünndarms nachgewiesen wurden. Humane neutrophile Peptide zeigen eine breite Aktivität gegen Bakterien, Viren und Pilze. Sie stellen außerdem eine direkte Verbindung zum adaptiven Immunsystem her, indem sie chemoattraktiv auf Monozyten, T-Zellen und dendritische Zellen wirken (Daher et al. 1986, Ganz et al. 1985, Ganz et al. 1995, Jones et al. 1992, Jones et al. 1993, Selsted et al. 1992, Yang et al. 2000). Das humane Defensin 5 (HD-5) bietet Schutz vor Darminfektionen (Quellette 1997). Von den Alpha-Defensinen leiten sich die Theta-Defensine ab, die bei den Makaken nachgewiesen wurden (Tang et al. 1999). Beim Menschen scheinen sie wohl angelegt zu sein, werden aber nicht exprimiert. Interessanterweise könnten sie bei der Resistenz gegen Retroviren eine Rolle spielen, zum Beispiel auch gegen HIV-1 (Owen et al. 2004).

Die Beta-Defensine wurden erstmals von Selsted et al. beschrieben (Selsted et al. 1993). Sie unterscheiden sich von den Alpha-Defensinen in ihrer Länge und in der Anordnung der Disulfid-Brücken.

Bislang sind beim Menschen sechs humane Beta-Defensine (hBD-1, -2, -3, -4, -5, -6) bekannt. hBD-1 wurde erstmals 1995 aus menschlichem Blutplasma isoliert (Bensch et al. 1995). Es folgten die Charakterisierung von hBD-2 aus Hautzellen an Psoriasis erkrankter Patienten (Harder et al. 1997), ebenso hBD-3 aus Keratinozyten (García et al. 2001a, Harder et al. 2001) und hBD-4 (García et al. 2001b).

HBD-1 wurde bereits in vielen epithelialen Geweben des Körpers nachgewiesen, unter anderem im Urogenitaltrakt, im Respirationstrakt, der Haut und in der Mundhöhle. Es ist ein aus 36 Aminosäuren zusammengesetztes kationisches Peptid mit sechs Cysteinen. Diese bilden im Molekül drei Disulfidbrücken aus. Es wird unreguliert exprimiert (Zhao et al. 1996). Seine antimikrobielle Aktivität ist nach H. D. Zucht im Vergleich zu den anderen antimikrobiellen Peptiden relativ gering (Zucht et al. 1998). Es besitzt eine chemotaktische Aktivität in Bezug zu unreifen dendritischen Zellen und T-Helfer Zellen (Yang et al. 1999). Nach Donald et al. 2003 und Sun et al. 2006 ist es als Tumorsuppressorgen in Erwägung zu ziehen, da ein häufiges Fehlen von hBD-1 bei Prostatakarzinomen und urogenitalen Karzinomen beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu ist hBD-2 regulierbar durch Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha und Interleukin-1-Beta, sowie durch Bakterien. Seine kationische Struktur ist mit 43 Aminosäuren geringfügig länger als hBD-1. Es ist besonders gut wirksam gegen gramnegative Bakterien und Pilze (*Candida albicans*) (Harder et al. 1997, Harder et al. 2000, Liu et al. 2002). Genau wie hBD-1 ist es in der Lage, chemotaktisch auf dendritische Zellen und T-Zellen zu wirken (Yang et al. 1999).

Im Vergleich zu den salzempfindlichen Defensinen hBD-1 und -2 besitzt hBD-3 eine gewisse Salztoleranz (García et al. 2001a, Harder et al. 2001). Dieses Peptid wird in vielen epithelialen und nicht-epithelialen Geweben des Menschen exprimiert (Harder et al. 2007). Außerdem wurde festgestellt, dass dieses Peptid im in-vitro-Versuch keine selbständigen Disulfid-Bindungen ausbildet, wie es bei hBD-1 und -2 der Fall ist (Wu 2003). Die Aktivierung von hBD-3 wird durch Interferon-Gamma sowie durch Bakterienkontakt induziert (García et al. 2001a, Harder et al. 2001). Es besitzt eine breite antimikrobielle Wirksamkeit gegen Bakterien und Pilze. Ein antibakterieller Effekt gegenüber resistenten Erregern wie z.B. dem Methicillin-resistenten *Staphylokokkus aureus* (MRSA) ist nachgewiesen (Midorikawa et al. 2003). HBD-3 verfügt genau wie die restlichen Beta-Defensine über chemotaktische Eigenschaften. Außerdem bewirkt es eine Mastzelldegranulation und erhöht somit die Gefäßpermeabilität (Chen et al. 2007).

HBD-4 zeigt wie hBD-1 und -2 eine Salz-Sensivität. Es besitzt eine um das sechsfache stärkere Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa* als die übrigen Beta-Defensine (García et al. 2001b). Im Allgemeinen scheint hBD-4 eine wichtige Rolle bei der angeborenen epithelialen Immunabwehr zu spielen. Eine hBD-4 Expression wurde auch im intestinalen Epithel beobachtet. Fahlgren et al. konnten einen

signifikanten Anstieg von hBD-3 und hBD-4 RNA-Expression bei Colitis ulcerosa nachweisen (Fahlgren et al. 2004).

Die Beta-Defensine hBD-5 und hBD-6 wurden als Isoformen im menschlichen Genom erkannt und deren Expression im menschlichen Ductus epididymidis nachgewiesen (Yamaguchi et al. 2002).

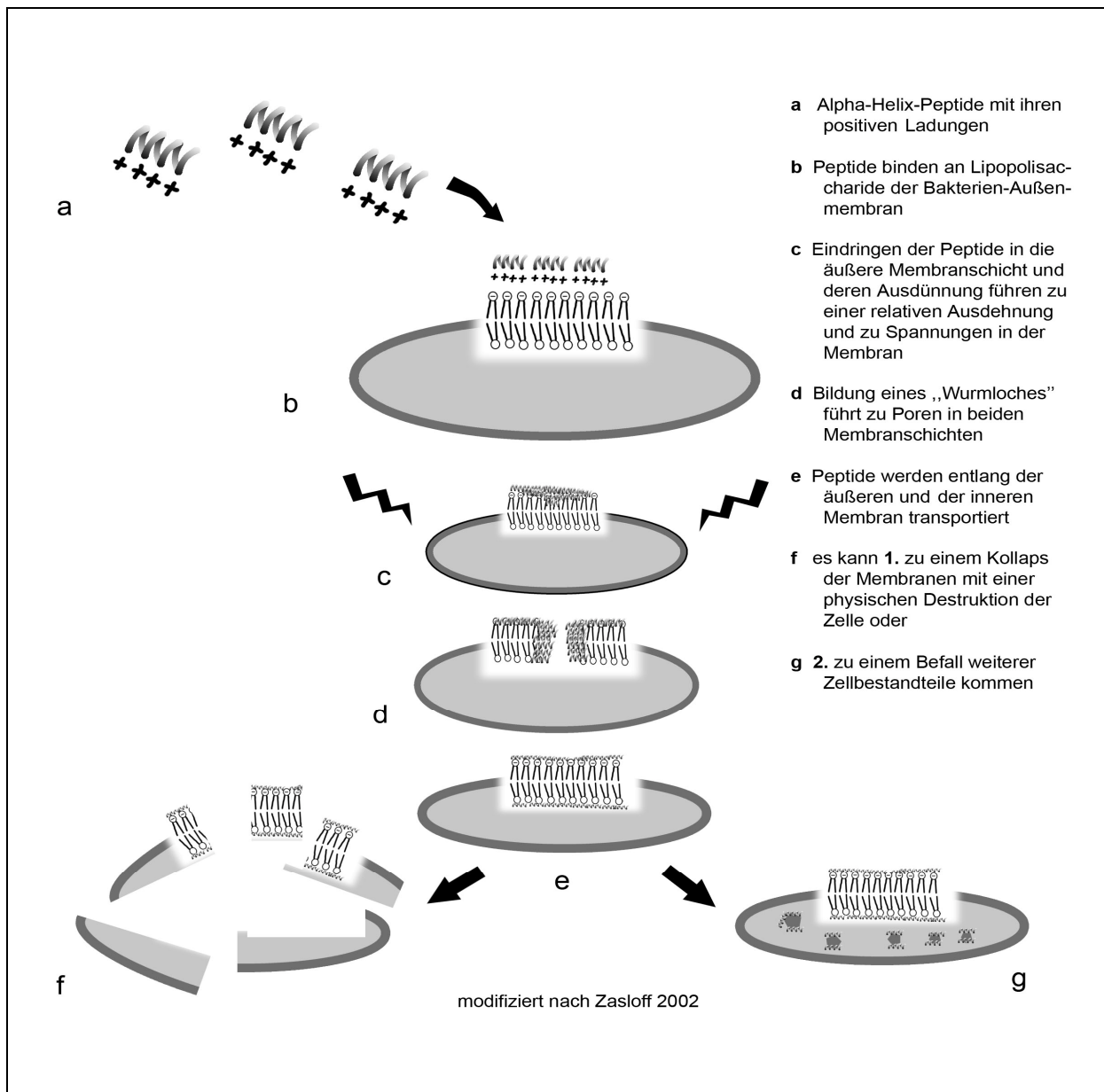
Die Steuerung der Freisetzung der Beta-Defensine ist unter anderem über die sogenannten Toll-like Rezeptoren geregelt. Von dieser Gruppe sind bislang bei Säugern 11 Rezeptoren bekannt (TLR 1-11). Sie sind in der Lage, bestimmte Signalketten auf pathogenen Erregern zu erkennen. Der TLR 4 beispielsweise ist ein bedeutender Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS) speziell auf gramnegativen Bakterien, der TLR 2 besitzt eine größere Bandbreite. Darunter sind Lipopeptide oder Lipoteichonsäuren auf grampositiven Bakterien erwähnenswert. Toll-like Rezeptoren können sich sowohl auf der Zellmembran von Immunzellen befinden, als auch im Zytoplasma oder auf der Membran von Zellorganellen (Iwasaki et Medzhitov 2004, Pasare et Medzhitov 2004, Takeda et Akira 2005). Mit der Aktivierung eines Toll-like Rezeptors wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, über die letztendlich proinflammatorische Signalproteine freigesetzt werden. Dies sind beispielsweise Interferon-Alpha und  $\gamma$ , sowie Interleukine. Die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden kann nun sowohl über die Produktion dieser Signalproteine erfolgen, als auch direkt über die Toll-like Rezeptoren moduliert werden (Froy 2005). Defensine sind heute in vielen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen wie der Haut (Harder et al. 2001), dem Respirationstrakt (Goldman et al. 1997) und dem Urogenitaltrakt (Valore et al. 1998).

Varoga et al. haben sich mit der Expression antimikrobieller Peptide in durch Osteoarthritis geschädigtem Gelenkknorpel und der Synovialflüssigkeit beschäftigt (Valore et al. 2004, Varoga et al. 2005, Varoga et al. 2006).

Auch in epithelialen Geweben im Kopfbereich sind die Defensine nachgewiesen (Dunsche et al. 2002).

Die genaue Funktionsweise der antimikrobiellen Peptide ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass sowohl durch physische Zerstörung der Zellmembran, als auch durch intrazelluläre Mechanismen eine Inaktivierung stattfindet. Nach dem von Zasloff 2002 entwickelten Shai-Matsuzaki-Huang-Modell kommt es zur Anlagerung der positiv geladenen antimikrobiellen Peptide an die

Bakterienmembran, verursacht durch die darin befindlichen negativ geladenen Gruppen, z.B. Lipopolysaccharide (LPS). Die antimikrobiellen Peptide führen zu einer Membrandestabilisierung und einer relativen Größenzunahme der äußeren Membran, wodurch sie in das Zellinnere gelangen können. Von dort kommt es entweder zu einem Zerfall der Membran, oder die Peptide können auf weitere Zellorganellen oder den Zellkern übergreifen (Boman 2003, Henzler-Wildman et al. 2004, Shai 2002, Zasloff 2002, Abb. 2).



**Abb. 2:** Dargestellt ist das Shai-Matsuzaki-Huang-Modell nach Zasloff 2002, nach welchem durch Anlagerung der antimikrobiellen Peptide zuerst die Zellwand an Integrität verliert. Dadurch können die Peptide in die Zelle eindringen. Dort führt dies entweder zu einem völligen Stabilitätsverlust der Membran (Lyse) oder zu einem Befall weiterer Zellorganellen.

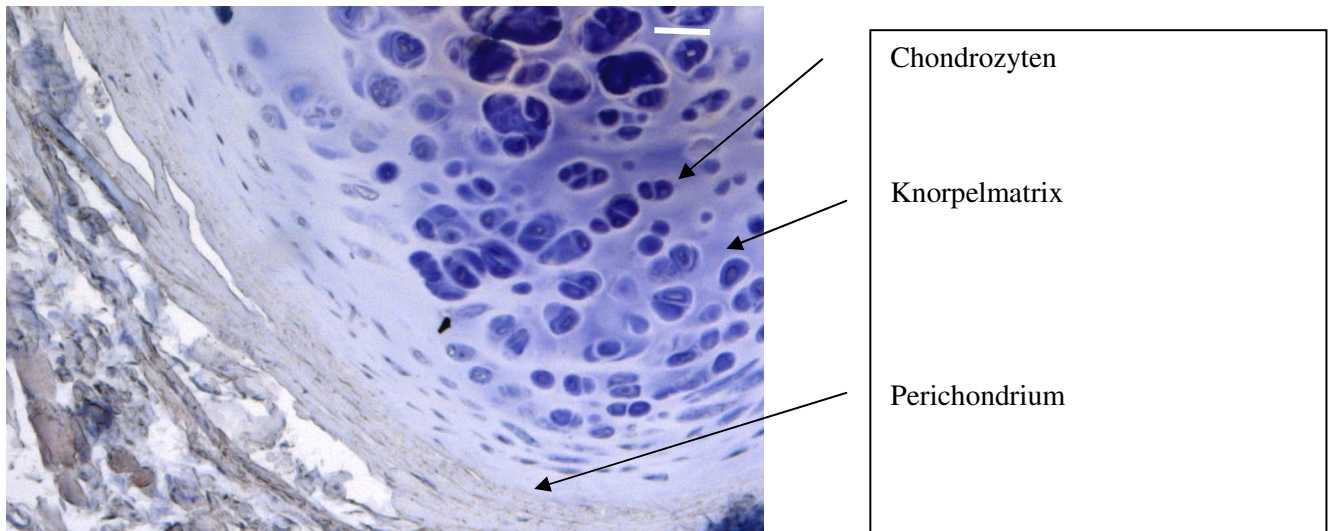
## 1.2 Anatomische Grundlagen des Nasen- und Ohrknorpels

Knorpelgewebe setzt sich im Allgemeinen aus Chondrozyten, das sind die Knorpelzellen, und einer Knorpelmatrix zusammen. Die Knorpelmatrix umgibt die Chondrozyten, welche in kleinen Gruppen angeordnet sind. Sie besteht aus Proteoglykanen, glykosylierten Glykoproteinen, sowie Kollagenfibrillen. Diese zugfesten Kollagenfibrillen bestehen zu einem großen Teil aus Kollagen vom Typ II, zu einem kleinen Teil aus Kollagen vom Typ IX und XI. Die Proteoglykane einerseits und die Kollagenfibrillen andererseits wirken nun als eine Art Gegenspieler. Es kommt zu einer inter- und intramolekularen Wassereinlagerung zwischen den Proteoglykanen, was eine Volumenvergrößerung bewirkt, der aber durch die Kollagenfibrillen entgegen gewirkt wird. Das Ergebnis ist eine Druckelastizität: Der Knorpel ist zwar komprimierbar, nimmt aber anschließend seine ursprüngliche Form wieder an. Diese Knorpelmatrix mit den eingelagerten Chondrozyten wird von einem Perichondrium umgeben, in dem die Kollagenfibrillen verankert sind. Es sorgt für zusätzliche Stabilität. Knorpelgewebe ist gefäßfrei, die Knorpelzellen werden ausschließlich über Diffusion versorgt.

Es werden drei Knorpeltypen unterschieden:

1. **Hyaliner Knorpel** ist am weitesten verbreitet und in dieser Studie für die Nasenknorpelproben von Bedeutung.
2. **Elastischer Knorpel** ähnelt dem hyalinen Knorpel im Aufbau, besitzt jedoch einen Anteil elastischer Fasern. Diese sind netzartig in die Knorpelmatrix eingelagert und sorgen für eine Druck- und Biegeelastizität. Dieser Knorpeltyp tritt unter anderem im Knorpelgewebe der Ohrmuschel auf, das in dieser Studie als Gewebeprobe verwendet wurde.
3. **Faserknorpel** ist von dicken Kollagenfasern durchsetzt und tritt beispielsweise in den Zwischenwirbelscheiben (Disci intervertebrales) auf. Er ist für diese Studie primär nicht von Bedeutung.

(Lüllmann-Rauch 2006: Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage, Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart)



**Abb. 3:** Darstellung von hyalinem Knorpelgewebe der Nase in Hämatoxylinfärbung  
weißer Balken = 20µm

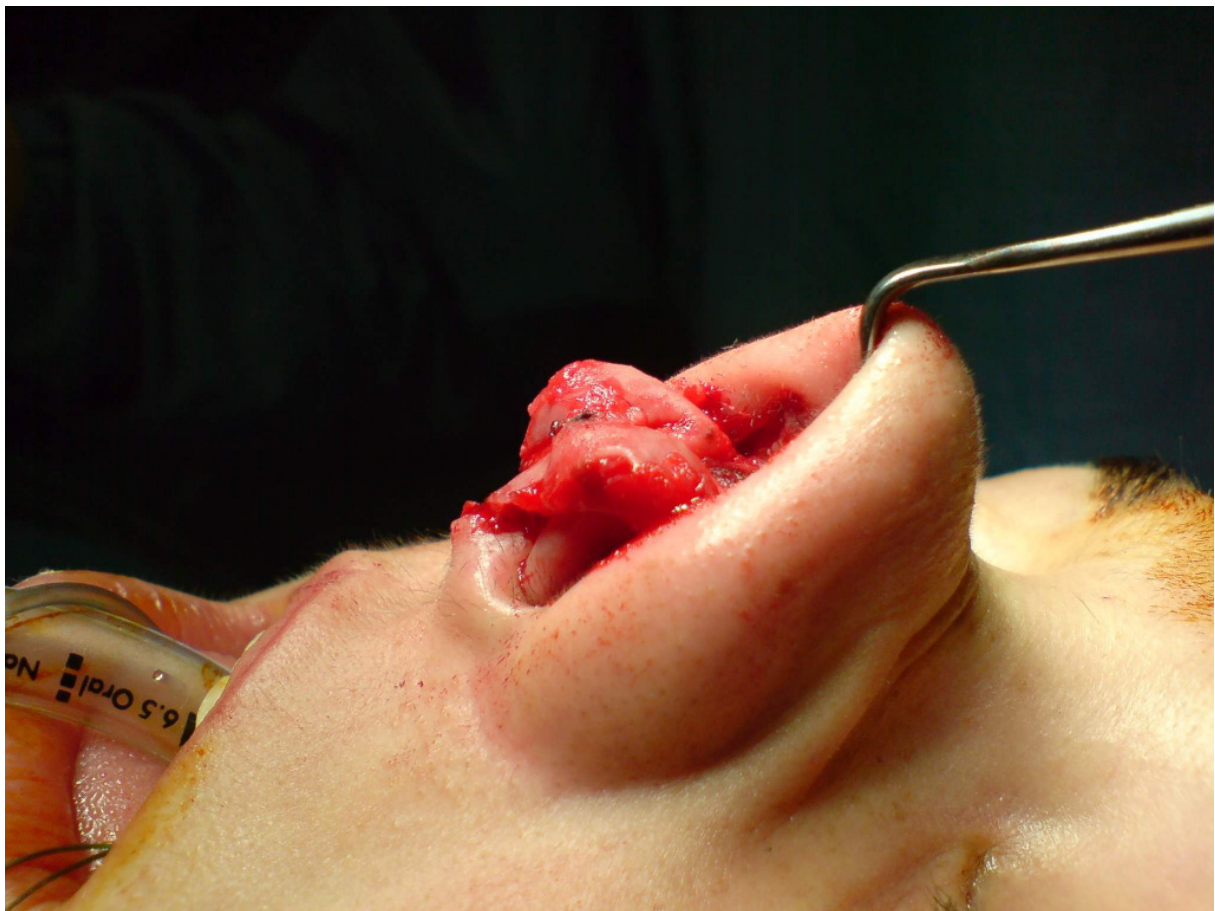
Die Gefäßversorgung des Nasenknorpels stammt aus dem Einstromgebiet der Arteria carotis interna über die Arteria ophthalmica, sowie der Arteria carotis externa über die Arteria maxillaris.

Die aus elastischem Knorpel aufgebaute Ohrmuschel wird einerseits von anterior über die Arteria temporalis superficialis und deren Abgänge Arteriae auriculares anteriores, sowie von posterior über die Arteria auricularis posterior versorgt. Beide Arterien entspringen aus der Arteria carotis externa. (Schünke, Schulte Schumacher, Voll, Wesker (2006): Prometheus Lernatlas der Anatomie, Band Kopf und Neuroanatomie, Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart)

Warnke et al. haben die humanen Beta-Defensine -1, -2, und -3 erstmals in humanem Knochen und in Osteoblastenkulturen nachweisen können (Warnke et al. 2005). Die drei Defensine schienen im oralen Knochen in größerer Menge als im übrigen Skelettsystem exprimiert zu werden. Dies könnte die hohe Infektionsresistenz des Mundhöhlenknochens bei kleinen oralchirurgischen Eingriffen (z.B. Zahnextraktionen) erklären. Auch der Nasenknorpel hat klinisch eine hohe Infektionsresistenz. Trotz fehlender Gefäßversorgung, die für eine Bereitstellung von Abwehrzellen des adaptiven Immunsystems notwendig wäre, sind Infektionen des Nasenknorpels bei operativen Eingriffen selten. Dieses ist bemerkenswert, da die direkte Nähe des Operationsfeldes zur kontaminierten Nasen- und Mundhöhle eine bakterielle Kontamination wahrscheinlich werden lässt.

Daher könnte ein bisher nicht entdecktes Immunsystem aus antimikrobiellen Peptiden die klinisch bekannte Infektionsresistenz des Nasenknorpels erklären. Gleiches gilt für den Ohrknorpel der Helix, der oft für die Rekonstruktion des Nasenknorpelgerüsts z.B. bei spaltbedingten Nasendefomitäten transplantiert wird.

Ziel dieser Studie ist es zu klären, ob die drei antimikrobiellen Peptide des Menschen vom Typ humanes Beta-Defensin -1, -2 und -3 im menschlichen Knorpelgewebe des Ohres und der Nase immunhistochemisch nachgewiesen werden können.



**Abb. 4:** Dargestellt ist ein freigelegtes Nasenknorpelgerüst im Rahmen einer Septorhinoplastik. Trotz der Nähe zur bakteriell kontaminierten Nasen- und Mundhöhle sind postoperative Infektionen des gefäßfreien Nasenknorpels selten.

## **2 Material und Methoden**

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (AZ.: D 411/09).

Die Studie ist Teil des Projekts MyJoint zur Herstellung des ersten biologischen Ersatzgelenkes, das von der Europäischen Union gefördert wird (FP6-NEST-0288619).

### **2.1 Knorpelpräparate post mortem und intra operationem**

Es wurden im ersten Teil der Studie jeweils 10 Biopsien von Nasenflügelknorpel und als Kontrolle 10 Biopsien von Ohrknorpel von insgesamt 10 anatomischen Leichenpräparaten entnommen.

Im zweiten Teil der Studie wurden sieben Knorpelproben von nasalem Septumknorpel und zwei Ohrknorpelproben im Rahmen von Nasenkorrekturoperationen (Septorhinoplastik) entnommen. Diese Proben stellten nicht weiter verwendbare Knorpelreste dar, die beim Konturieren des Knorpels zur Bestimmung der Nasenform anfallen. Ziel war der Nachweis der humanen Beta-Defensine -1, -2 und -3.

Zusätzlich wurde noch von jedem Präparat eine negative Kontrolle mitgefärbt, die nicht mit hBD-Antikörpern markiert wurde.

Als positive Kontrolle verwendeten wir Proben aus menschlicher Mundschleimhaut. Für Mundhöhlenepithel ist der positive Nachweis von den drei humanen Beta-Defensinen belegt (Dunsche et al. 2001, Dunsche et al. 2002).

Diese Kontrolle wurde genau wie die Proben mit hBD-1, -2 und -3, sowie als Negativkontrolle angefärbt.

Die in vivo entnommenen Proben stammten aus Septorhinoplastik-Operationen und Ohrplastiken bei Tumorpatienten und stellten nicht weiter verwendbare Gewebereste dar.

### **2.2 Einbettung und Schneiden**

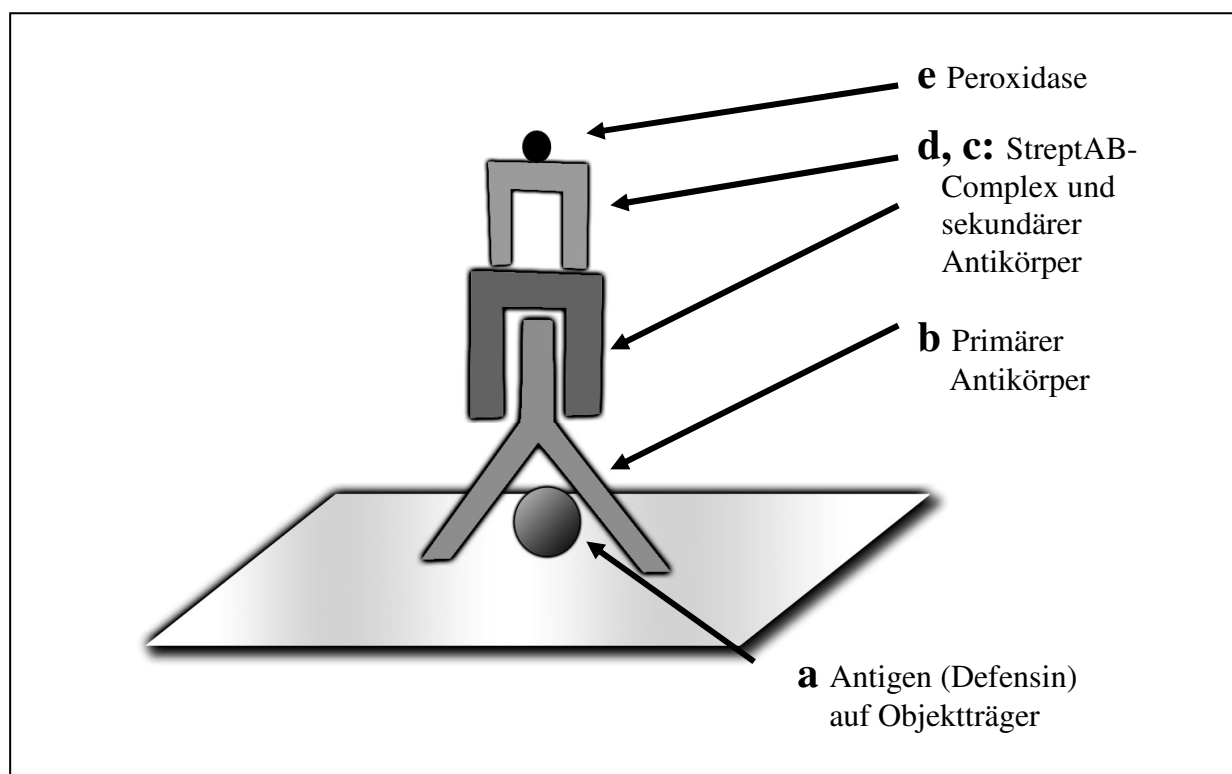
Die Gewonnenen Proben wurden nach der Fixierung in Formalin (J.T. Baker, 37%, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA) zuerst in Paraffin (Paraplast, McCormick REF 501006, McCormick Scientific, St. Louis, USA) eingebettet. Anschließend erfolgte die



Herstellung der Schnitte mit dem Mikrotom (Reichert-Jung, Heidelberg, Germany) in 4 µm Dicke. Zur weiteren Bearbeitung wurden diese auf Glasobjektträger (Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Germany) übertragen.

### 2.3 Immunhistochemischer Defensinnachweis

Der immunhistochemische Defensinnachweis erfolgte nach der Streptavidin-Biotin-Complex-Technik (StreptAB-Complex), nach der zuerst die Defensine mittels passender Antikörper markiert werden. An diese Antikörper koppelt nun ein zweiter Antikörper. Dieser stellt über Biotin eine Verbindung mit dem StreptAB-Complex her. Der StreptAB-Complex ist mit Meerrettich-Peroxidase behaftet. Diese sorgt nach dem Farbsubstratauftrag schließlich für den Farbumschlag und die Markierung (Abb. 5).



**Abb. 5:** Dargestellt ist die Funktion der Antigenmarkierung mittels primärem Antikörper und StreptAB-Complex. Das im Gewebe auf dem Objektträger befindliche Antigen (a) wird zuerst mit dem primären spezifischen Antikörper (b) markiert. An diesen binden dann ein sekundärer Antikörper und der Strept-AB-Complex (c,d). Dieser enthält die Peroxidase (e), die für den späteren Farbumschlag zuständig ist.

### 2.3.1 Vorbereitung der Materialien

#### 2.3.1.1 Entparaffinisieren

Für die Entparaffinerisierung wurden folgende Materialien benötigt:

Xylol (J.T. Baker,  $C_6H_4(CH_3)_2$ )  
 Ethanol (J.T. Baker, absolut)  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck KGaA, 30% Perhydrol pro analysi, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)  
 14 Glasküvetten mit Deckel (Roth H 554.1, CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Germany)  
 Aqua destillata (destilliertes Wasser)

Es wurden jeweils drei Küvetten mit Xylol beschickt und eine absteigend verdünnte Ethanolreihe angesetzt in der Reihenfolge 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 60% , 50%. Die restlichen Küvetten befüllten wir mit destilliertem Wasser und einer auf 3 % verdünnten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung.

#### 2.3.1.2 TBS-Pufferlösung

Es wurde eine Pufferlösung hergestellt, die sowohl zur Lagerung diente, als auch im Rahmen der immunhistochemischen Färbung weiter Verwendung fand. Es handelte sich um Tris-Buffered-Saline (TBS), bestehend aus 0,05 M Tris HCL und 0,15 M NaCl.

Wir haben für unseren Versuch zuerst drei je zwei Liter fassende Kolben mit Pufferlösung angesetzt.

Dazu wurden folgende Materialien verwendet:

Tris HCl (Firma Sigma, Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid, Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, USA)  
 NaCl (Merck KGaA)  
 elektrische Waage (Sartorius 1212 MP, Sartorius AG, Göttingen, Germany)  
 Magnetrührgerät (IKA-Combimag RCT, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)  
 pH-Wert Messgerät (Eider)  
 NaOHaq (Natronlauge 5 Molar, Merck)

Dazu wurden pro Gefäß 15,7g Tris HCL und 17,52g NaCl mit destilliertem Wasser vorerst bis auf circa 1,9 Liter Gesamtvolumen aufgefüllt und mit einem Magnetrührgerät bis zur vollständigen Auflösung vermischt.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Hilfe eines Messgeräts auf einen Wert von 7,6 eingestellt. Da bei unseren Versuchen der pH-Wert immer nach oben korrigiert werden musste, verwendeten wir dazu ausschließlich NaOHaq (Natronlauge). Zur Absenkung des pH-Wertes kann dafür HCLaq (Salzsäure) verwendet werden.

Es hat sich eine 5 molare Lösung als vorteilhaft herausgestellt, da aufgrund der recht hohen Konzentration der Lauge nur ein geringes Volumen zugeführt wurde. Wichtig war, dass am Ende genau 2 Liter Lösung vorhanden waren, damit die Konzentrationsverhältnisse des Puffers stimmten. Daher wurde nach dem Einstellen des pH-Wertes die noch fehlende Menge bis auf 2 Liter Gesamtvolumen mit destilliertem Wasser ergänzt. Das spätere Zufügen von geringen Mengen destillierten Wassers hat auf den eingestellten pH-Wert nur einen minimalen zu vernachlässigenden Einfluss.

## **2.3.2 Vorbereitung der Reagenzien**

### **2.3.2.1 Primärer Antikörperkomplex**

Der primäre Antikörperkomplex bestand aus Kaninchen-Antikörpern, die gegen die humanen Beta-Defensin -1, -2, und -3 gerichtet waren.

Dazu wurden folgende Materialien benötigt:

Rinderalbumin TBA(Sigma, Albumin Bovine, Fraction V) Anti-Human Kaninchen-Antikörper gegen hBD-1, -2 und -3 (Anti-Beta-Defensin-1 DEF01-S, Anti-human-Beta-Defensin-2 DEF002, Beta-Defensin-3 DEF03-A, Biologo Dr. Hartmut Schultheiß e.K., Kronshagen, Germany ) Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Germany) justierbare Pipette (Eppendorf)
--

Wir stellten 50ml einer 1%igen Rinderalbumin-Tris-Buffered-Saline-Lösung her. Das pulverförmige Rinderalbumin wurde dazu mit einem Rüttelgerät im TBS-Puffer in Lösung gebracht. Wir verwendeten dazu ein elektrisches Rüttelgerät (REAX top, Heidolph).

Die drei primären Kaninchen-Antikörper wurden nun jeweils im Verhältnis 1:500 mit der Rinderalbuminlösung verdünnt. Zuvor zentrifugierten wir die Antikörper auf den Boden des Gefäßes, damit aufgrund der geringen Menge sämtliche Flüssigkeit mit der Pipette zu erreichen war.

### **2.3.2.2 Sekundärer Antikörper-Komplex**

Der sekundäre Antikörper-Komplex stellt die chemische Verbindung zu dem primären Kaninchen-Antikörper her. Er enthielt die Meerrettich-Peroxidase, die später das Substrat für die Farbreaktion spaltete.

Für die Herstellung wurden folgende Materialien benötigt:

Strept AB Complex/ HRP Duet Mouse/Rabbit Box (Firma DakoCytomation, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany)

mit drei Substanzen: A= Streptavidin,

B= Biotinylated Peroxidase,

C= Biotinylated Goat Anti-Mouse/Rabbit 1%

50µl der Reagenz C (sekundärer biotinylierter Ziegenantikörper) wurden mit 5ml TBS-Puffer vermischt.

Für die spätere Farbreaktion wurden nun jeweils 50µl der Reagenzien A (Streptavidin) und B (Meerrettich-Peroxidase) mit 5ml TBS-Puffer vermischt, die Lösung muss für 15 Minuten stehen.

### **2.3.2.3 Diaminobenzidin-Substrat (DAB)**

1 DAB-Substrat Tablette (DakoCytomation Diaminobenzidine Tabletten, Code Nr. S 3000)

justierbare Pipette (Eppendorf Research)

Aluminiumfolie

Als letzter Schritt folgte das Ansetzen des DAB-Substrates, das später für die Farbreaktion verantwortlich war. Dazu musste eine DAB-Tablette unter Lichtschutz in 10ml TBS-Puffer aufgelöst werden. Davon wurden 4ml in ein sauberes Gefäß pipettiert und mit 30µl 3%igem Wasserstoffperoxid vermischt.

Als Lichtschutz wählten wir normale Haushalts-Aluminiumfolie, welche um das Gefäß gewickelt wurde.

### **2.3.3 Die Entparaffinisierung**

Da die Proben nun in Paraffin vorlagen, mussten sie für die immunhistochemische Färbung wieder in wässriges Medium zurückgeführt werden.

Nun wurden die Präparate nacheinander in die drei Küvetten mit Xylol für das grobe Entfernen des Paraffins gebracht und die Proben für jeweils 10 Minuten darin belassen. Es erwies sich als hilfreich, wenn die Präparate vor der Entparaffinisierung für ca. 60 Minuten im 37°C warmen Brutschrank (Firma Binder) erwärmt wurden.

Im Anschluss folgte die absteigende Ethanol-Reihe angefangen bei 100%. Diese bewirkt eine schonende Rückführung in ein wässriges Medium sowie eine Entfettung, ohne die Proben zu schädigen. Die Schnitte wurden für jeweils fünf Minuten darin belassen.

Zur Inaktivierung der zellulären Peroxidase in den Schnitten wurde die nun in das 3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bad eingebracht. Dieser Schritt war wichtig, da später durch eine künstliche Peroxidase-Reaktion der positive Farbumschlag verursacht wurde. Die intrazellulär vorhandene Peroxidase würde ein falsch-positives Ergebnis liefern. Die Proben wurden für zuerst fünf Minuten in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sowie anschließend zur Spülung in destilliertem Wasser für jeweils fünf Minuten belassen.

Anschließend wurden die Proben in TBS Puffer-Lösung gelagert, um sie vor Austrocknung zu schützen.

### **2.3.4 Färbung der Schnitte**

Im Anschluss an die Paraffinentfernung konnte die immunhistochemische Färbung erfolgen. Dafür wurden folgende Materialien benötigt:

Dako-Pen (DakoCytomation)  
justierbare Pipette (Eppendorf Research)  
primäre Antikörper (siehe 2.3.2 Vorbereitung der Reagenzien)  
StreptAB-Komplex (siehe 2.3.2 Vorbereitung der Reagenzien)  
DAB-Substrat (siehe 2.3.2 Vorbereitung der Reagenzien)  
TBS-Puffer (siehe 2.3.1 Vorbereitung der Materialien)  
Rinderalbumin-TBS-Lösung (siehe 2.3.2)

Zuerst wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit dem Dako-Pen umrandet. Dadurch waren sie leichter zu identifizieren, und die wasserabweisende Farbe diente als Barriere für die aufzutragenden Substanzen.

#### **2.3.4.1 Primärer Antigen-Antikörper Komplex**

Anschließend konnten die primären Kaninchen-Antikörper für hBD-1, -2, -3, sowie als reine Rinderalbumin-TBS-Puffer Lösung für die Negativkontrolle im Überschuss aufgetragen werden.

Dies erfolgte mittels einer auf die nötige Menge voreinstellbaren Pipette (Eppendorf). Für jedes Präparat hat sich dabei eine Menge von 100-150 µl Flüssigkeit je nach Größe des Präparates als vorteilhaft erwiesen. Die primären Antikörper binden an die humanen Beta-Defensine im Gewebe.

Nach einer Einwirkzeit von zwei Stunden wurden die Präparate in drei TBS-Pufferbädern für jeweils fünf Minuten gespült.

#### **2.3.4.2 Sekundärer biotinylierter Ziegenantikörper**

Die mit Kaninchenantikörpern markierten Präparate wurden nun mit biotinyliertem Ziegenantikörper versehen. Das Auftragen erfolgte wiederum im Überschuss, um eine optimale Benetzung zu gewährleisten. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurden die Schnitte erneut in drei TBS Pufferbädern für jeweils fünf Minuten gewaschen.

Durch den sekundären Antikörper wurde eine Verbindung für den folgenden StreptAB-Komplex geschaffen, der die Peroxidase für den späteren Farbumschlag enthält.

### **2.3.4.3 Strept-AB Komplex/HRP**

Anschließend wurde die zuvor hergestellte Strept-AB-Komplex Lösung im Überschuss aufgetragen und wirkte für 30 Minuten ein. Bei dieser Reaktion entstand ein Komplex zwischen den Antikörpern und Meerrettich-Peroxidase (HRP), welche später das Substrat spaltete und für einen Farbumschlag sorgte.

Es folgte das Waschen in drei Pufferbädern für jeweils fünf Minuten.

### **2.3.4.4 Färbung mit Diaminobenzidine (DAB) Tabletten**

Zuletzt konnte das Auftragen des DAB-Substrates erfolgen. Dieses wurde im Überschuss aufgetragen und für 5-10 Minuten inkubiert. Eine längere Inkubation führte zu einer kräftigeren Farbreaktion, was für die jeweilige Situation abgeschätzt werden musste.

Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gespült.

### **2.3.5 Hämatoxilin-Gegenfärbung und Eindeckeln der Präparate**

Für die Darstellung des Gewebehintergrunds wurden die Präparate mit Hämatoxilin eingefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit Glyceringelatine fixiert und mit Deckgläsern versehen. Dazu wurden folgende Materialien benötigt:

Hämatoxilin (Hämalaun nach Mayeer, Merck KgaA)  
Objektträgerdeckel (Deckgläser in verschiedenen Größen, Menzel)  
Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine, Merck 1.09242.0100)

Die Glyceringelatine musste vor Anwendung im Brutschrank (BINDER GmbH, Tuttlingen, Germany) verflüssigt werden bei ca. 60 °C.

Die Hintergrund-Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxilin. Dazu wurden die Präparate im Ständer kurz in eine Küvette mit Hämatoxilin getaucht (ca. 5-10 Sekunden) und für 10 Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült. Die Salze des Leitungswassers sorgten in diesem Fall für die Farbreaktion. Dabei war auf einen langsamen Wasserfluss zu achten, um die Präparate nicht zu beschädigen.

Zum Schluss wurden die Präparate kurz mit Destilliertem Wasser gespült und mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt. Nach 24 Stunden Trocknungszeit konnten die Präparate mit dem Mikroskop untersucht werden.

## 2.4 Semiquantitative Analyse der Immunfärbung

Als Maßstab für die Immunreaktion galt die Intensität des Farbumschlags der Proben. Ein starker Farbkontrast deutete auf eine starke Immunreaktion hin. Dies wiederum nahmen wir als Hinweis auf eine größere Anhäufung antimikrobieller Peptide.

Wir generierten ein Punktesystem zur quantitativen Bewertung des beobachteten Farbumschlages. Dieses setzte sich wie folgt zusammen:

Die Punktbewertung wurde von einem unabhängigen Juror durchgeführt, der nicht über Art der immunhistochemischen Färbung oder das vorliegende Präparat informiert war.

- 1 Punkt: für Immunreaktion innerhalb der Chondrozyten
- 1 Punkt: für Immunreaktion entlang des Perychondriums
- 1 Punkt: für feine Immunbanden 1-2 Chondrozytenbreiten in die Knorpelmatrix hinein
- 1 Punkt: Extrapunkt für breite Immunbanden innerhalb der Knorpelmatrix größer als 2 Chondrozytenbreiten

## 2.5 Grafische Auswertung

Für die mikroskopisch-grafische Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde das Nikon Microphot-FXA Microscope (Nikon Inc, New York, USA), mit Kamera Axio-Cam MRc5 (Carl Zeiss AG, Jena, Germany) verwendet. Diese Kamera war ein digitaler Mikroskopaufsatz, der an den Videoanschluss eines PCs gekoppelt werden konnte.

Dort wurden die eigentlichen Aufnahmen mittels der Software Axio Vision Rel 4.6 der Firma Zeiss angefertigt. Die Software besaß automatische Einstellung für Belichtung, Farbe und Weißabgleich, sowie eine Hilfe zur Schärfereinstellung am Mikroskop. Außerdem konnte ein Größenmaßstab auf das Bild eingefügt werden.

Die aufgenommenen Bilder konnten im Format JPEG auf der Festplatte abgelegt werden, wo sie zur Auswertung und weiteren Bearbeitung zur Verfügung standen.



Die Beschriftungen und Pfeile wurden mit der Textverarbeitungssoftware Word 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany) und der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop (Adobe Systems GmbH, München, Germany) bearbeitet.

## **3 Ergebnisse**

Die Studie wurde in zwei Teile gegliedert. Es wurden 10 Proben Nasenknorpel und 10 Proben Ohrknorpel post mortem entnommen, sowie sieben Proben Nasenknorpel und zwei Proben Ohrknorpel intra operationem entnommen untersucht.

### **Teil 1:**

#### **3.1 Nasenflügelknorpel post mortem entnommen**

In den post mortem entnommenen und immunhistochemisch angefärbten Proben des Nasenflügelknorpels zeigten sich deutliche Immunreaktionen. Das war für alle 3 Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 der Fall.

Die Farbreaktion war in allen Präparaten von Perichondrium ausgehend zu finden. Diese zeigte sich auch innerhalb der Chondrozyten im Zytoplasma und schien von dort auf die Knorpelmatrix überzugreifen. Dieser Effekt war allerdings nur in einem schmalen Bereich jenseits des Perichondriums zu beobachten. (Abb. 6-9)

#### **3.2 Ohrknorpel post mortem entnommen**

Auch bei den Proben des Ohrknorpels konnten wir eindeutige Farbreaktionen erkennen. Alle drei Defensine waren besonders im Perichondrium stark angefärbt, sowie teilweise im Zytoplasma der Chondrozyten. Auch zeigte sich eine Infiltration der Knorpelmatrix, welche größtenteils bei den hBD-3 markierten Proben am deutlichsten zu sehen war. (Abb. 10-13)

### **Teil 2:**

#### **3.3 Nasenflügelknorpel intra operationem entnommen**

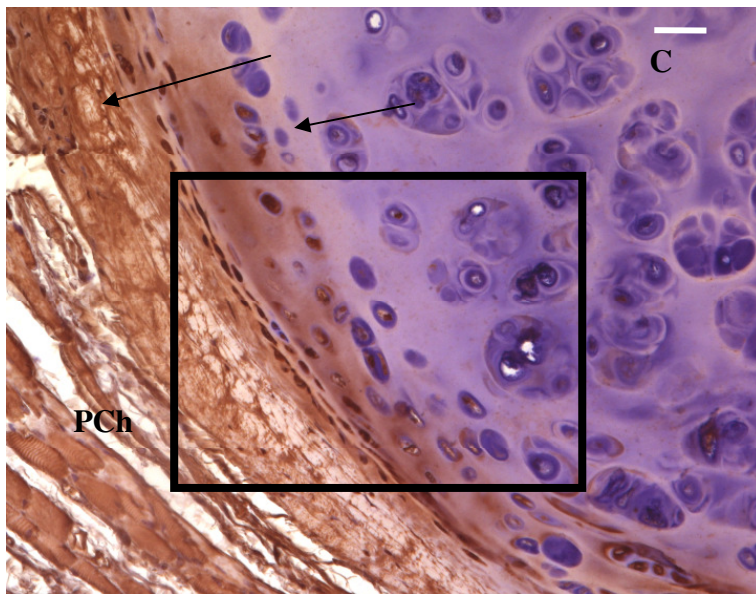
Die intra operationem entnommenen Knorpelproben ließen eine deutliche Immunreaktion erkennen. Dies war sowohl im Perichondrium, als auch in einigen Chondrozyten zu beobachten. Auch die Knorpelmatrix zeigte in den Randbereichen eine deutliche Braunverfärbung. (Abb. 14-15.)

#### **3.4 Ohrknorpel intra operationem entnommen**

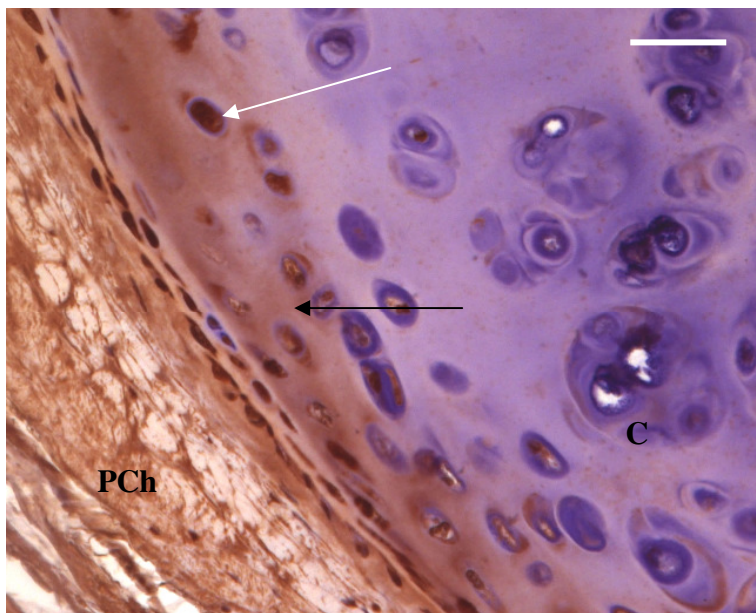
Der Ohrknorpel ließ eine ähnliche Strukturierung der Farbreaktionen erkennen wie die übrigen Proben. Das Perichondrium war sehr deutlich erkennbar verfärbt, auch

das Zytoplasma einiger Chondrozyten zeigte eine klare Immunreaktion. Die Knorpelmatrix war in den verschiedenen Proben unterschiedlich stark markiert, am deutlichsten bei hBD-3. (Abb. 16-17)

### 3.1 Nasenknorpel post mortem entnommen



a



b

#### Abbildung 6:

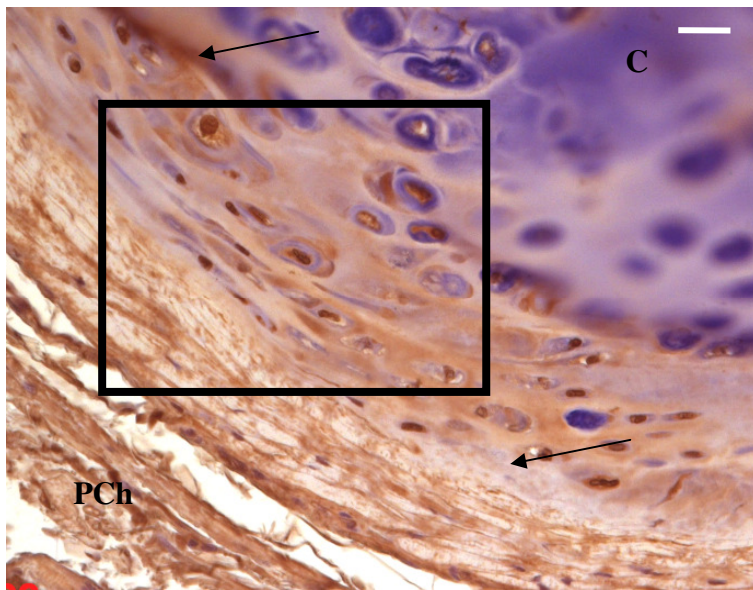
Darstellung von hBD-1 im post mortem entnommenen Nasenknorpel

[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

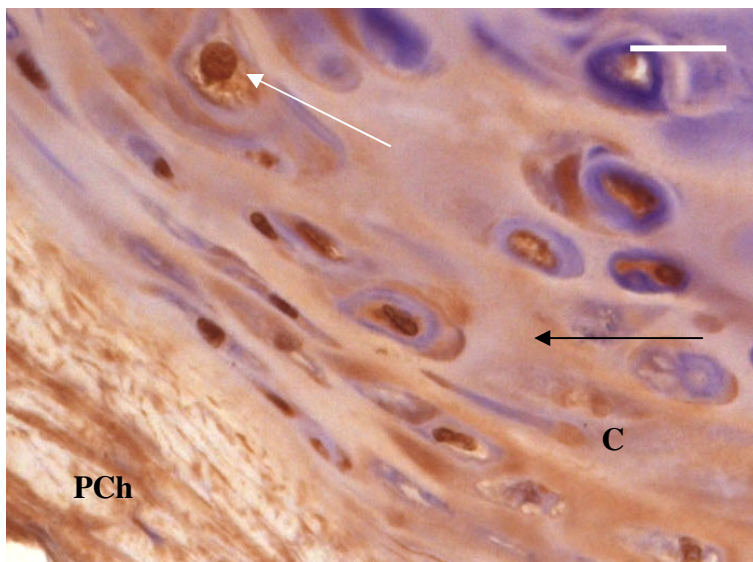
[a]: Braunfärbung des Perichondriums mit Ausbreitung in die Knorpelmatrix (schwarze Pfeile)

[b]: brauner Farbumschlag bis in die Knorpelmatrix hinein (schwarzer Pfeil)  
Farbreaktion auf hBD-1 Expression sogar in Chondrozyten nachweisbar (weißer Pfeil)

weißer Balken = 20µm



a



b

### Abbildung 7:

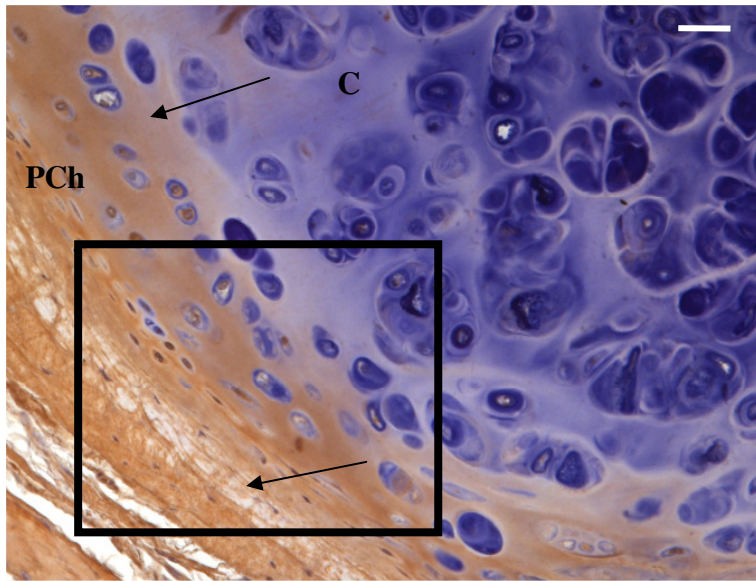
Darstellung von hBD-2 im post mortem entnommenen Nasenknorpel

[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

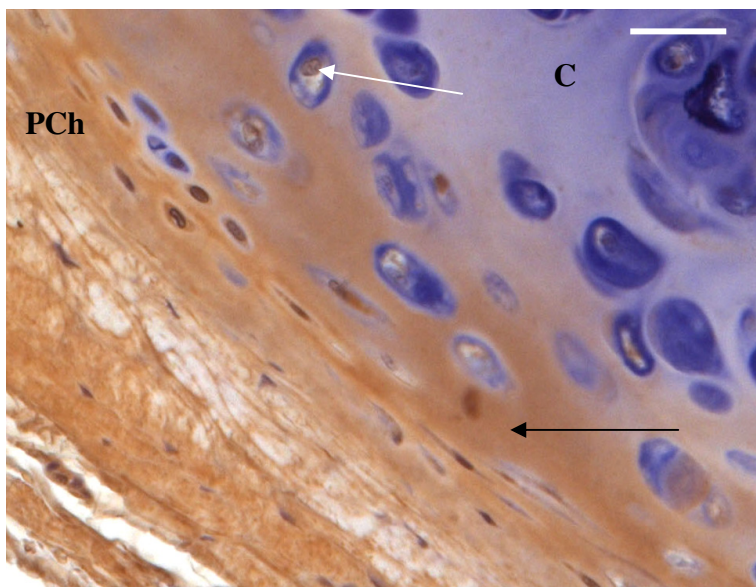
[a]: Braunfärbung des Perichondriums mit Ausbreitung in die Knorpelmatrix (schwarze Pfeile)

[b]: brauner Farbumschlag bis in die Knorpelmatrix hinein (schwarzer Pfeil)  
Farbreaktion auf hBD-2 Expression sogar in Chondrozyten nachweisbar (weißer Pfeil)

weißer Balken = 20µm



a



b

**Abbildung 8:**

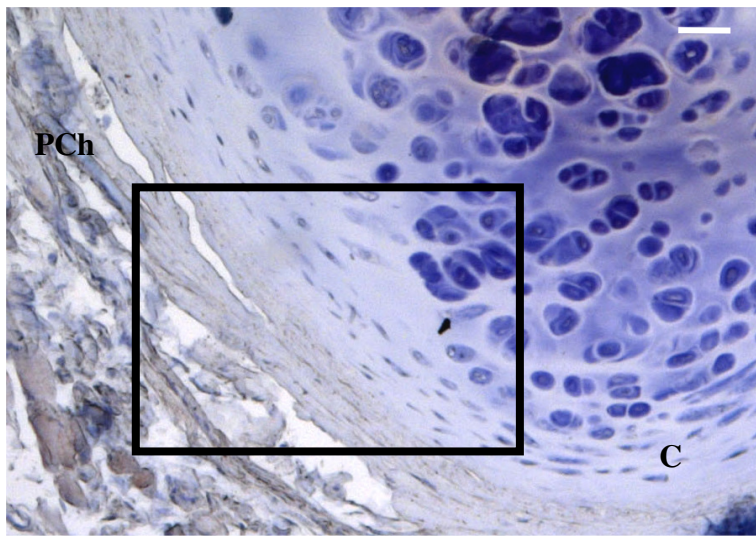
Darstellung von hBD-3 im post mortem entnommenen Nasenknorpel

[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

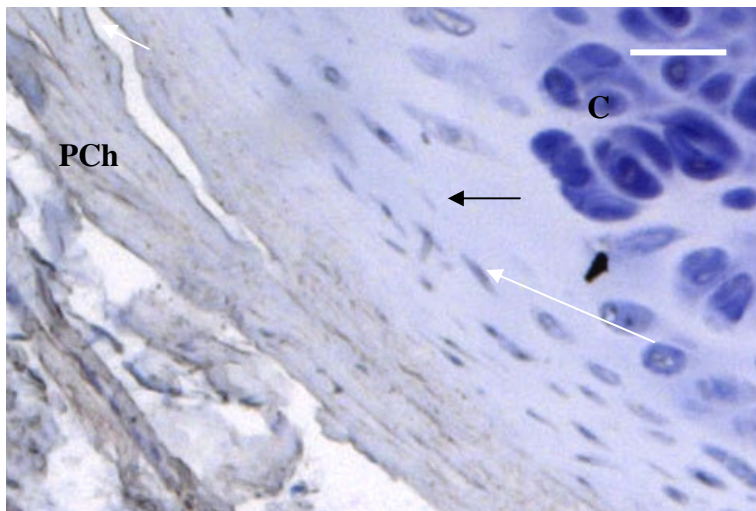
[a]: Braunfärbung des Perichondriums mit Ausbreitung in die Knorpelmatrix (schwarze Pfeile)

[b]: brauner Farbumschlag bis in die Knorpelmatrix hinein (schwarzer Pfeil)  
Farbreaktion auf hBD-3 Expression sogar in Chondrozyten nachweisbar (weißer Pfeil)

Insgesamt ist hBD-3 stärker ausgeprägt als die anderen beiden Beta-Defensine.  
weißer Balken = 20µm



a



b

**Abbildung 9:**

Darstellung der Negativ-Kontrolle des post mortem entnommenen Nasenknorpels

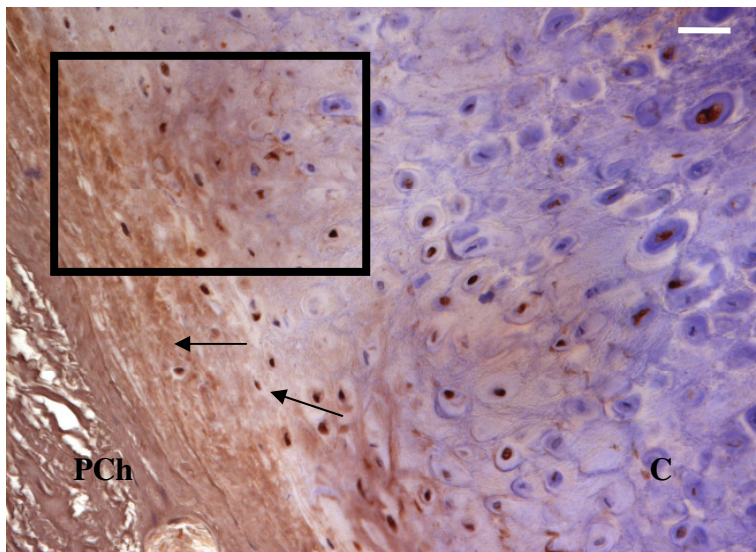
[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

[a]: keine Braunfärbung erkennbar

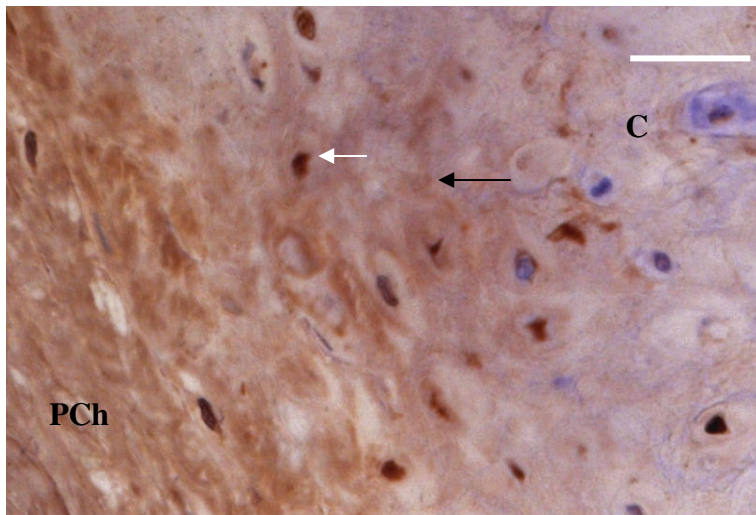
[b]: weder braune Farbreaktion in der Knorpelmatrix (schwarzer Pfeil),  
noch in Chondrozyten nachweisbar (weißer Pfeil)

weißer Balken = 20µm

### 3.2 Ohrknorpel post mortem entnommen



**a**



**b**

#### **Abbildung 10:**

Darstellung von hBD-1 im post mortem entnommenen Ohrknorpel

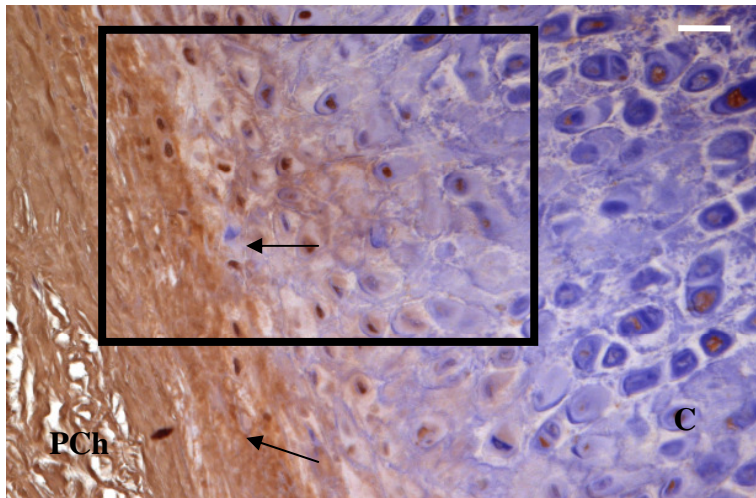
[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

[a]: Braunfärbung des Perichondriums mit Ausbreitung in die Knorpelmatrix (schwarze Pfeile)

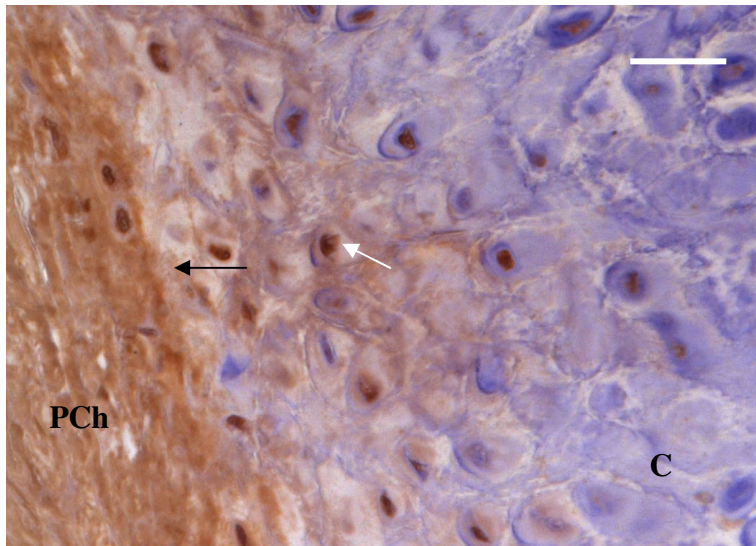
[b]: brauner Farbumschlag bis in die Knorpelmatrix hinein (schwarzer Pfeil)  
Farbreaktion auf hBD-1 Expression sogar in Chondrozyten nachweisbar (weißer Pfeil)

weißer Balken = 20µm





a



b

**Abbildung 11:**

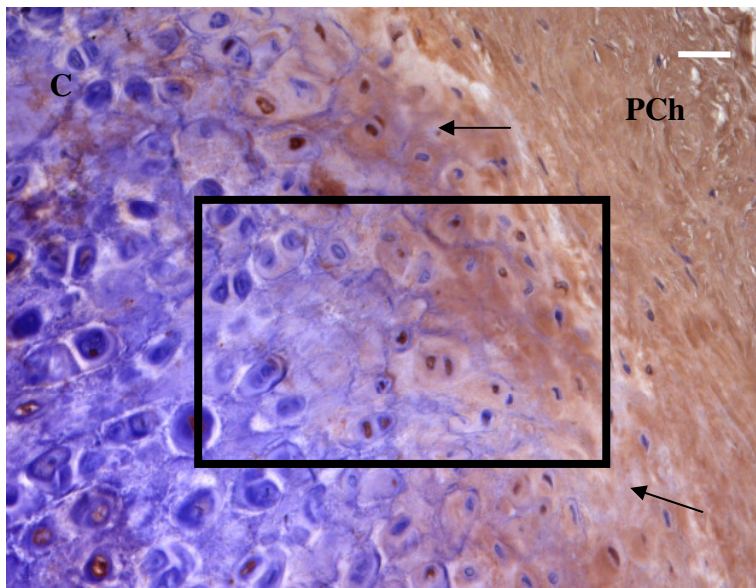
Darstellung von hBD-2 im post mortem entnommenen Ohrknorpel

[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

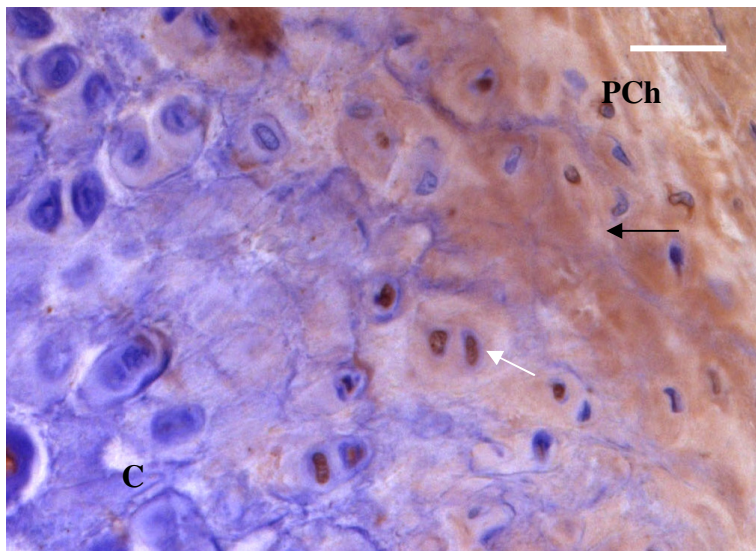
[a]: Braunfärbung des Perichondriums mit Ausbreitung in die Knorpelmatrix (schwarze Pfeile)

[b]: brauner Farbumschlag bis in die Knorpelmatrix hinein (schwarzer Pfeil)  
Farbreaktion auf hBD-2 Expression sogar in Chondrozyten nachweisbar (weißer Pfeil)

weißer Balken = 20µm



a



b

**Abbildung 12:**

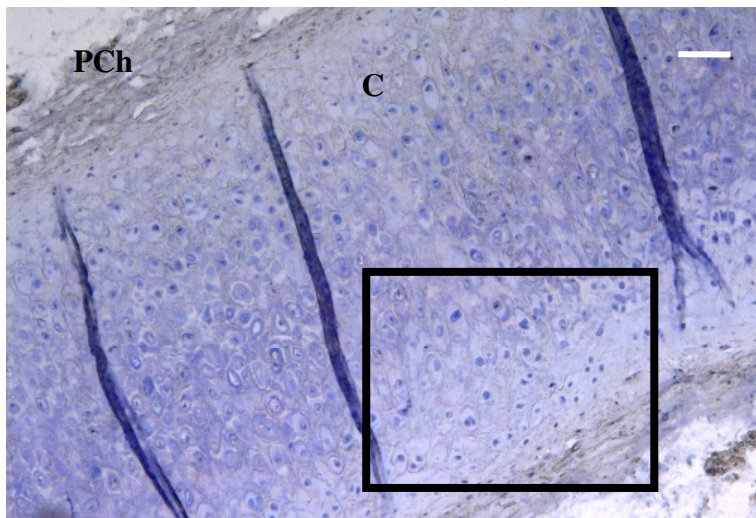
Darstellung von hBD-3 im post mortem entnommenen Ohrknorpel

[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

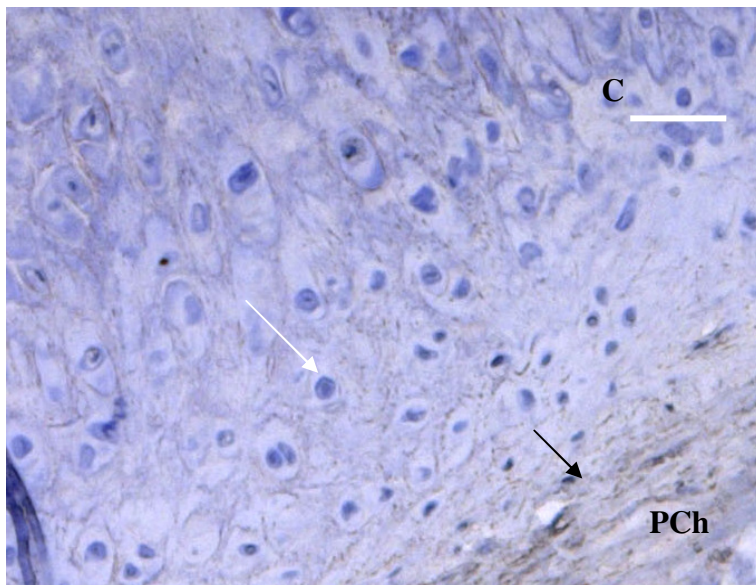
[a]: Braunfärbung des Perichondriums mit Ausbreitung in die Knorpelmatrix (schwarze Pfeile)

[b]: brauner Farbumschlag bis in die Knorpelmatrix hinein (schwarzer Pfeil)  
Farbreaktion auf hBD-3 Expression sogar in Chondrozyten nachweisbar (weißer Pfeil)

Insgesamt ist hBD-3 stärker ausgeprägt, als die anderen beiden Beta-Defensine  
weißer Balken = 20µm



a



b

**Abbildung 13:**

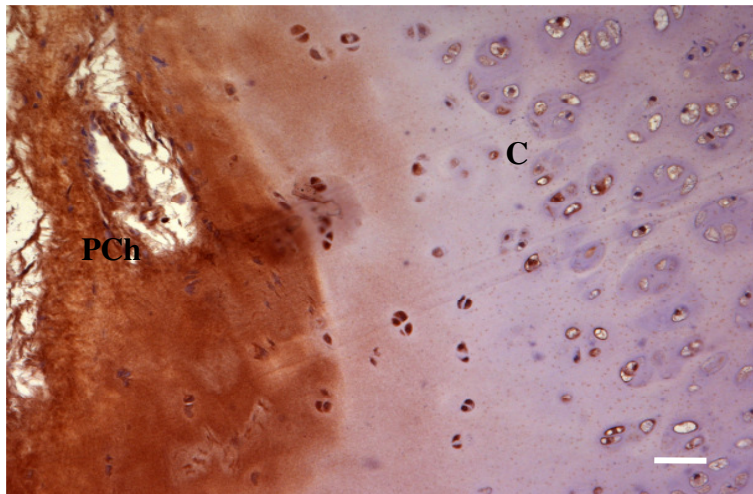
Darstellung der Negativ-Kontrolle des post mortem entnommenen Ohrknorpels

[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

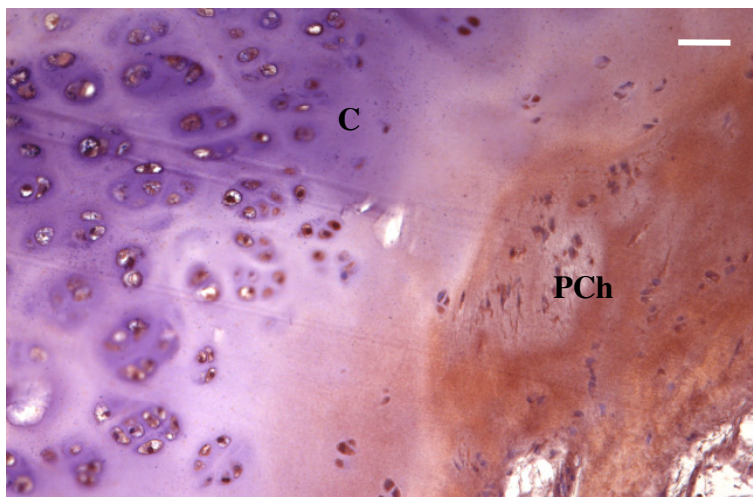
[a]: keine Braunfärbung erkennbar

[b]: weder braune Farbreaktion im Perichondrium (schwarzer Pfeil),  
noch in Chondrozyten nachweisbar (weißer Pfeil)

### 3.3 Nasenknorpel intra operationem entnommen



**a**



**b**

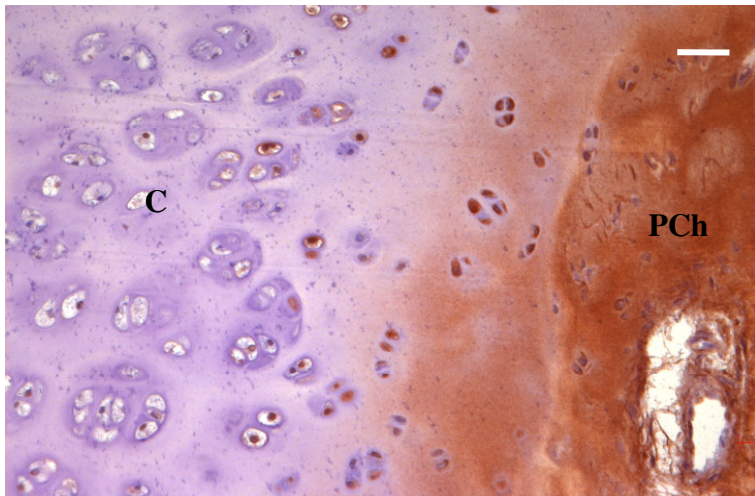
#### **Abbildung 14:**

Darstellung der immunhistochemischen Untersuchung von intra operationem entnommenem Nasenknorpelgewebe

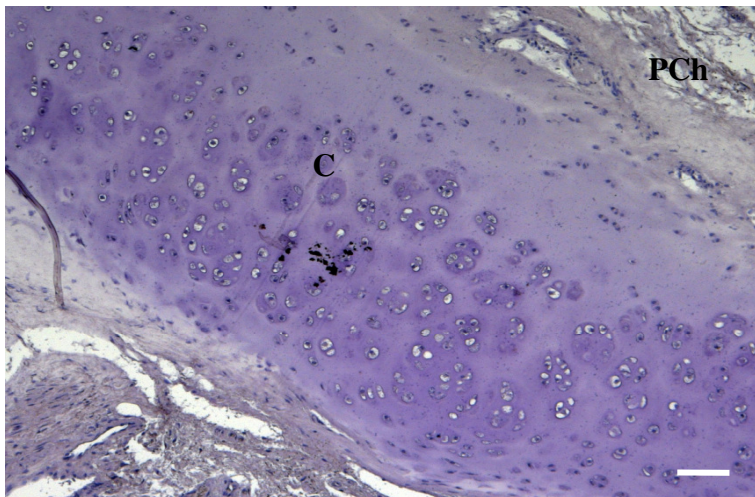
[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

[a]: Anfärbung von hBD-1 sowohl im Perichondrium, als auch in Zellen erkennbar

[b]: hBD-2 ist deutlich mit braunem Marker versehen



a



b

**Abbildung 15:**

Darstellung der immunhistochemischen Untersuchung von intra operationem entnommenem Nasenknorpelgewebe

[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

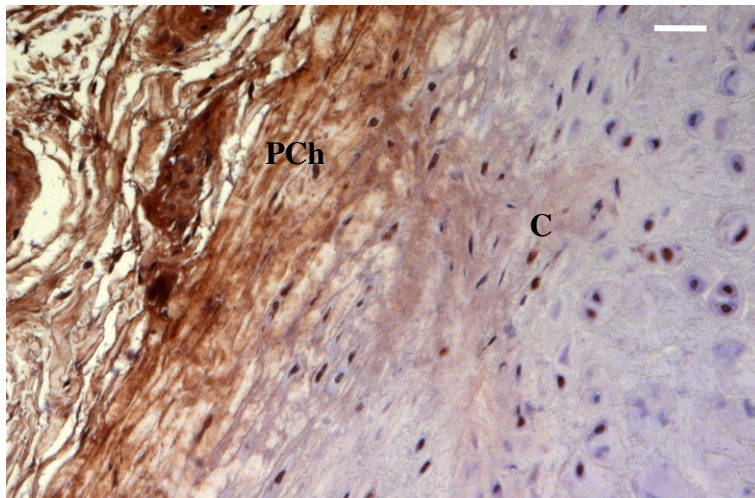
[a]: hBD-3 ist sowohl im Perichondrium, als auch in Chondrozyten erkennbar

Auch hier ist der Farbumschlag deutlicher ausgeprägt, als bei Abb. 14 [a] und [b].

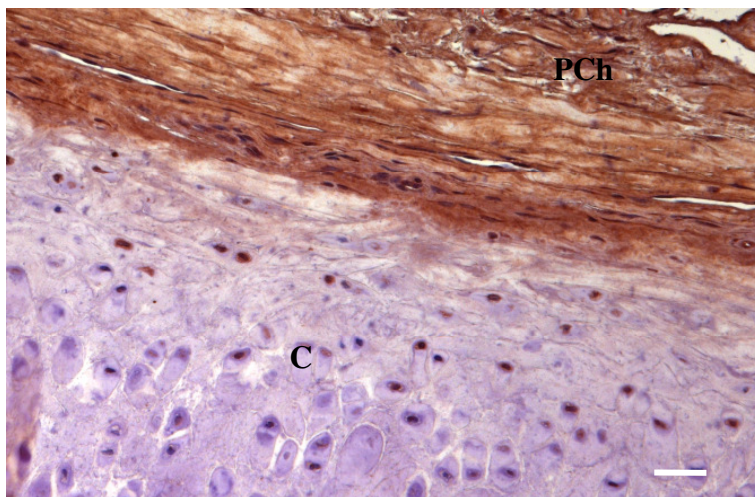
[b]: Negativkontrolle; keine braune Verfärbung erkennbar

weiße Balken = 20µm

### 3.4 Ohrknorpel intra operationem entnommen



**a**



**b**

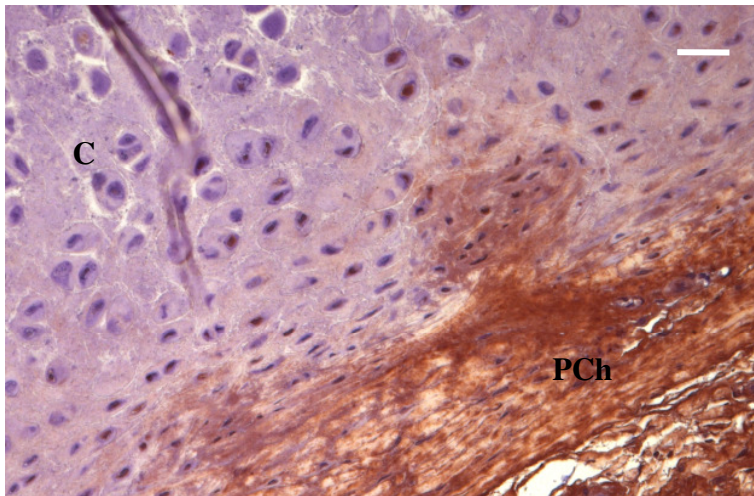
**Abbildung 16:**

Darstellung der immunhistochemischen Untersuchung von intra operationem entnommenem Ohrknorpelgewebe

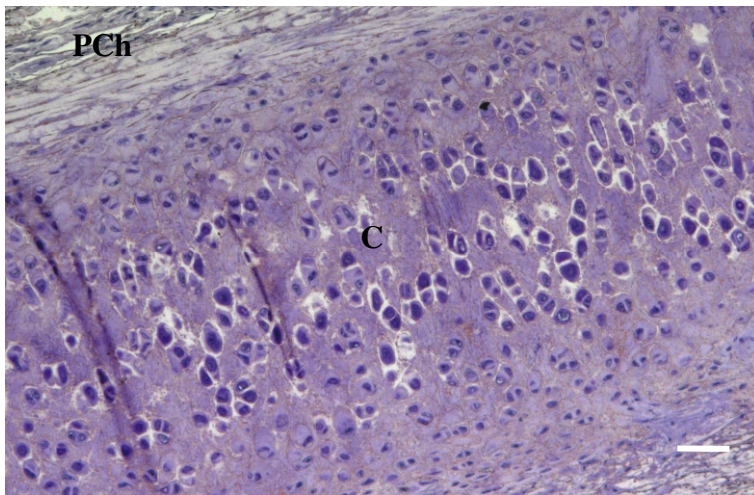
[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

[a]: Anfärbung von hBD-1 sowohl im Perichondrium, als auch in Zellen erkennbar

[b]: hBD-2 ist deutlich mit braunem Marker versehen



a



b

**Abbildung 17:**

Darstellung der immunhistochemischen Untersuchung von intra operationem entnommenem Ohrknorpelgewebe

[C: Knorpelmatrix, PCh: Perichondrium]

[a]: HBD-3 ist sowohl im Perichondrium, als auch in Chondrozyten erkennbar, die Farbreaktion ist allerdings deutlicher, als bei Abb. 16 [a] und [b].

[b]: Negativkontrolle; keine braune Verfärbung erkennbar

weißer Balken = 20µm

### 3.5 Semiquantitative Analyse der Immunreaktion

Zur quantitativen Bewertung der Farbreaktionen wurde ein Punktsystem mit maximal 12 möglichen Punkten eingeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit unter den verschiedenen Proben zu erreichen.

Die Präparate wurden mit dem Mikroskop rein subjektiv beurteilt und bewertet.

Das Punktesystem setzte sich wie folgt zusammen:

1 Punkt: für Immunreaktion innerhalb der Chondrozyten

1 Punkt: für Immunreaktion entlang des Perichondriums

1 Punkt: für feine Immunbanden 1-2 Chondrozytenbreiten in Knorpelmatrix hinein

1 Extrapunkt für breite Immunbanden in Knorpelmatrix größer als 2 Chondrozytenbreiten

Wie in folgenden Tabellen und Grafiken veranschaulicht, wurden die verschiedenen Proben aus Ohr- und Nasenknorpel jeweils intra operationem und post mortem entnommen gegenübergestellt. Zusammengefasst waren die Antikörper hBD-1 und hBD-2 deutlich schwächer markiert, als hBD-3.

Zwischen den unterschiedlichen Proben einer hBD-Gruppe waren jedoch keine nennenswerten Unterschiede nachzuweisen. Sowohl die Proben aus Nase und Ohr, als die intra operationem und post mortem entnommenen Präparate wiesen ungefähr einen Punktwert von 9 auf.

Allerdings ließen sich Unterschiede in der Verteilung der unterschiedlichen Beta-Defensine erkennen. So waren die Defensine hBD-1 und hBD-2 durchschnittlich mit jeweils zwei bis drei Punkten vertreten, während für hBD-3 gemittelt zwischen drei und vier Punkte verteilt werden konnten (Tabelle 1, Abb. 18).

Kontrollen:

Wir führten sowohl eine positive, als auch eine negative Kontrolle durch. Für die positive Kontrolle verwendeten wir wie schon zu Anfang erwähnt Proben der Mundschleimhaut. Für Mundhöhlenepithel ist der positive Nachweis von den drei humanen Beta-Defensinen belegt (Dunsche et al. 2001, Dunsche et al. 2002).



Die positiven Kontrollen wurden genau wie die Knorpelproben mit hBD-1, -2 und -3 Antikörpern markiert und gefärbt. Außerdem wendeten wir die negative Kontrolle auf sie an.

Die negative Kontrolle enthielt alle Schritte der Immunfärbung, außer dass der primäre Antikörperkomplex durch reine Rinderalbumin-Puffer-Lösung ersetzt wurde, wie schon im Teil Material und Methoden beschrieben. Wie erwartet zeigte sich in der negativen Kontrolle keine Farbreaktion.

### Teil 1

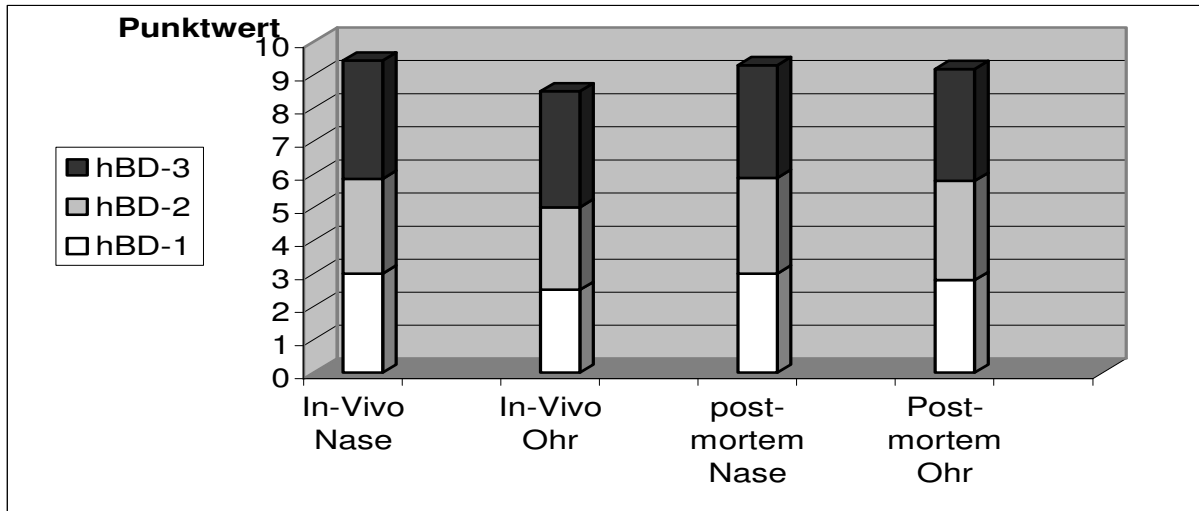
Knorpelprobe	hBD-1	hBD-2	hBD-3	Gesamtpunktzahlen
Post mortem Nase	+++	++(+)	+++	9,29
Post mortem Ohr	++(+)	+++	+++	9,18

**Tab. 1:** Semiquantitative Analyse der post mortem entnommenen Knorpelproben  
Es ist die subjektiv beurteilte Ausprägung der Farbreaktion darstellt. Für die Analyse wurde ein Punktesystem erstellt mit einer maximalen Punktzahl von 12.

### Teil 2

Knorpelprobe	hBD-1	hBD-2	hBD-3	Gesamtpunktzahlen
Intra operationem Nase	+++	++(+)	+++(+)	9,43
Intra operationem Ohr	++(+)	++(+)	+++(+)	8,5

**Tab. 2:** Semiquantitative Analyse der intra operationem entnommenen Knorpelproben  
Es ist die subjektiv beurteilte Ausprägung der Farbreaktion darstellt. Für die Analyse wurde ein Punktesystem erstellt mit einer maximalen Punktzahl von 12.



**Abb. 18** zeigt grafisch die Verteilung der drei humanen Beta-Defensine in jeweils einem Präparat anhand einer Punkteverteilung mit maximal 12 möglichen Punkten.

## 4 Diskussion

In dieser Studie sollte der Frage nachgegangen werden, ob im Nasen- und Ohrknorpelgewebe ein eigenes Immunsystem auf der Basis von antimikrobiellen Peptiden nachweisbar ist. Diese Frage konnte beantwortet werden.

In den vergangen beiden Jahrzehnten wurde ein bis dato völlig unentdecktes angeborenes Immunsystem erforscht. Dieses ist in der Lage zellunabhängig auf der Basis von antimikrobiellen Peptiden zu agieren. Diese Peptide sind in der Lage, fremde Zellen direkt und ohne Umweg über das langsamere zelluläre Immunsystem zu eliminieren (Boman 2003). Antimikrobiellen Peptide wurden bereits bei vielen Pflanzen (Fernandez de Caley et al. 1972), Insekten (Boman et al. 1991), Amphibien (Zasloff 1987) und Säugern (Yang et al. 2002) nachgewiesen.

Beim Menschen sind antimikrobielle Peptide auf Epithelien, den Panethzellen des Dünndarms, sowie in den Leukozyten des Blutes entdeckt worden. Nach Boman 2003 sorgen sie für eine Art Gleichgewicht zwischen den fakultativ pathogenen Keimen und deren symbiotischem Nutzen. Das heißt, sie reduzieren automatisch die Anzahl der Bakterien auf ein nicht schädliches Maß und halten sie von gefährdeten Bereichen fern. An einigen erblichen Mangelerkrankungen werden die schwerwiegenden Folgen des Fehlens eines dieser Peptide, des Cathelicidins LL-37 erkennbar (Pütsep et al. 2002).

Die Arbeit dieser Moleküle läuft für den Körper wesentlich schneller und energiesparender ab, als über den Umweg der Antigenerkennung des erworbenen Immunsystems (Boman 2003).

Wie bereits erwähnt stellen beim Menschen die Gruppen der Alpha- und die Beta-Defensine die wichtigsten Vertreter dar.

HBD-1 wurde zuerst aus Blutplasma isoliert (Bensch et al. 1995) und ist mittlerweile in fast allen epithelialen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen.

Es folgte die Isolierung von hBD-2 und -3 aus Hautzellen von an Psoriasis erkrankter Patienten (García et al. 2001a, Harder et al. 1997, Harder et al. 2001).

Von den Beta-Defensinen gelten hBD-2 und -3 als regulierbar durch Interleukine, Tumornekrosefaktor-Alpha, sowie durch Interferon-Gamma (García et al. 2001a, Harder et al. 2001, Liu et al. 2002).

Varoga et. al. haben bereits antimikrobielle Peptide im Gelenkknorpel des Menschen nachgewiesen (Varoga et al. 2004, Varoga et al. 2005, Varoga et al. 2006).

Für uns hat sich daraufhin die Frage gestellt, ob humane Beta-Defensine auch im Nasen- und Ohrknorpel des Menschen auftreten.

Operationen am Nasenknorpel gehören zum klinischen Alltag in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, sowie der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde. Nasendeformitäten kommen insbesondere bei Kindern mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten vor. Diese Lippen-Kiefer-Gaumen Spalten sind die zweithäufigste Fehlbildung des Menschen (1:500), und fast jeder junge Patient braucht um das 18. Lebensjahr eine Nasenkorrektur-Operation, die immer mit Freilegung des Nasenknorpels einhergeht. Außerdem nehmen ästhetische Korrektur-Operationen der Nase einen immer höheren Stellenwert ein.

Bisher waren Mediziner in der medikamentösen Bekämpfung von Erregern fast ausschließlich auf Antibiotika angewiesen. Dass diese Tatsache mehr und mehr zu einem Problem wird, zeigen aktuelle klinische Studien, die sich mit der zunehmenden Entwicklung resistenter Bakterienstämme in den Industrienationen beschäftigen (Rossolini, Matengoli, 2008). Durch die Zunahme resistenter Bakterienstämme besitzen antimikrobielle Peptide eine immer größer werdende medizinische und pharmakologische Relevanz.

Die Regulierbarkeit der antimikrobiellen Peptide durch Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktoren, sowie über Toll-like Rezeptoren stellt eine Schnittstelle für medikamentöse Eingriffsmöglichkeiten dar. Wenn diese Reaktionsmechanismen entschlüsselt werden können, könnte die Infektionsresistenz weiter verbessert werden. Das gilt für alle Bereiche des Körpers.

Insbesondere für Osteoarthritis und Gelenkknorpel wäre dieser Mechanismus wertvoll. Zukünftige Studien befassen sich mit diesem Thema.

In dieser Studie haben wir im ersten Teil 10 Proben Nasenknorpel und 10 Proben Ohrknorpel post mortem aus Leichenpräparaten entnommen und untersucht. Im zweiten Teil wurden 7 Proben Nasenknorpel und 2 Proben Ohrknorpel im Rahmen von Septorhinoplastiken entnommen. Diese Proben wurden in Paraffin eingebettet

und mit dem Mikrotom geschnitten. Anschließend folgte die immunhistochemische Färbung und Untersuchung auf die humanen Beta-Defensine 1, 2 und 3.

Für die farbliche Markierung der vermuteten Defensine verwendeten wir die Streptavidin-Biotin-Technik. Es handelt sich hierbei um eine Routinediagnostik, die sich im immunhistochemischen Labor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in Kiel bewährt hat. Sie wurde streng nach Angaben des Herstellers, sowie ergänzend nach laboreigenen Protokollen durchgeführt.

Die zuerst verwendete Substratlösung AEC (DakoCytomation AEC Substrat-Chromogen, Code Nr. K 3464) erwies sich für Knorpelgewebe als zu ungenau, da sich der Farbstoff in die Knorpelmatrix einzulagern schien. Das wiederum führte zu falsch positiven Ergebnissen.

Mit den anschließend verwendeten Substrat DAB (DakoCytomation Diaminobenzidine (DAB) Tabletten, Code Nr. S 3000) erzielten wir bessere Ergebnisse.

Die angefärbten Präparate wurden unter dem Mikroskop subjektiv beurteilt und mit einer digitalen Kamera aufgenommen.

Für eine bessere Auswertungsmöglichkeit kreierten wir ein punktbasiertes Bewertungssystem mit einer maximal möglichen Punktzahl von 12 Punkten. Die Punktbewertung erfolgte durch einen unabhängigen Juror, der nicht über Art der immunhistochemischen Färbung oder das vorliegende Präparat informiert war.

Die unterschiedlichen Knorpelproben wiesen in ihrer Gesamt-hBD-Konzentration keine nennenswerten Unterschiede auf. Bei allen vier Proben wurde jeweils eine ungefähre Gesamtpunktzahl von neun Punkten beobachtet. Allerdings wiesen die Proben Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Beta-Defensine auf. So war hBD-3 deutlich stärker ausgeprägt als hBD-1 und -2 (über drei Punkte im Gegensatz zu 2-3 Punkten bei hBD-1 und -2, Tab. 1).

Die Defensinausbreitung schien vom Perichondrium auszugehen und von dort den äußeren Rand der Knorpelmatrix zu infiltrieren. Außerdem waren in vielen Präparaten die Chondrozyten selbst farblich markiert, was auf eine chondrozytäre Defensinproduktion hindeutet. Diese Hypothese ist allerdings nicht eindeutig, könnten die Defensine so auch vom Perichondrium aus über Endozytose in die

Chondrozyten aufgenommen worden sein. Genaueres müssen zukünftige Studien zeigen.

Diese Erkenntnisse könnten in der plastischen Chirurgie Anwendung finden. Das äußere Erscheinungsbild gewinnt für die Menschen zunehmend an Bedeutung. So sind resorbierbare und mit antimikrobiellen Peptiden beschichtete Membranen denkbar, die bei Chondroplastiken während der Einheilung Schutz- und Stützfunktion bieten.

Zukünftige Studien müssen zeigen, ob antimikrobielle Peptide auch auf den Gelenkknorpel übertragbare Schutzfunktionen bieten können. Varoga et al. konnten eine Hochregulation von hBD-3 in osteoarthritisch geschädigtem Gelenkknorpel nachweisen. Dort wurden über hBD-3 extrazelluläre-Matrix-abbauende Matrix-Metallo-Proteinase (MMPs) aktiviert, was letztendlich zu einer Schädigung des Knorpelgewebes beitrug (Varoga et al. 2005). Grundlage für diese Knorpeldegeneration waren allerdings entzündliche Prozesse, wie sie bei osteoarthritischer Knorpeldegeneration vorkommen. Die genauen Vorgänge wurden bisher nur annähernd erforscht.

Es ist daher von großer Bedeutung, diese Regulationsmechanismen der antimikrobiellen Peptide bei Entzündungsvorgängen in humanem Knorpelgewebe genau zu verstehen. Durch die genaue Kenntnis der anabolen und katabolen Eigenschaften der Moleküle könnten diese in der Chirurgie Anwendung finden und für den gezielten Aufbau und Erhalt von Knorpelgewebe genutzt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Entwicklung resistenter Bakterienstämme stellt die Medizin vor zunehmende Probleme. Antimikrobielle Peptide könnten in diesem Fall Abhilfe schaffen und zeigen eine außerordentliche medizinische Relevanz. Sie besitzen die Fähigkeit, auf molekularer Basis zellunabhängig Bakterien zu identifizieren und zu eliminieren. Sie wurden bereits in vielen epithelialen Geweben des menschlichen Körpers, im Blut, sowie im Knochen entdeckt und haben ein neues Bild des menschlichen Immunsystems aufgeworfen. Durch ihre Regulierbarkeit könnten sie eine Alternative zu den herkömmlichen Antibiotika darstellen.

Operationen an Nasen- und Ohrknorpelgewebe stellen Routineoperationen im klinischen Alltag der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie und der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde dar. Wiederherstellungsplastiken der Nase und der Ohren im Rahmen von ästhetischen Operationen nehmen einen immer höheren Stellenwert ein.

Uns hat nun die Frage interessiert, ob antimikrobielle Peptide auch im menschlichen Ohr- und Nasenknorpelgewebe auftreten. Besonders der Nasenknorpel ist beständig der keimbelasteten Nasenhöhle ausgesetzt. Trotz seiner geringen Durchblutung treten wenig Infektionen bei operativen Eingriffen auf.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 Knorpelproben aus Nase und Ohr von menschlichen Leichenpräparaten entnommen. Außerdem wurden sieben Proben Nasenknorpel und zwei Proben Ohrknorpel aus lebendem Gewebe während plastischer Operationen gewonnen. Diese Proben wurden immunhistochemisch angefärbt und auf die humanen Beta-Defensine -1, -2 und -3 untersucht. Die angefärbten Präparate wurden digital erfasst, mittels eines Punktesystems bewertet und die Daten statistisch ausgewertet.

In allen Proben konnten die humanen Beta-Defensine nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich bei hBD-3 die deutlichsten Ergebnisse. Zwischen den einzelnen Gewebetypen konnten in Bezug auf die Defensine keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden. Es zeigten sich deutliche Farbreaktionen im Perichondrium, der Knorpelmatrix und den Chondrozyten.

## 6 Literaturverzeichnis

Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 195-9.

Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett*. 1995; 368: 331-5.

Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature*. 1972; 237: 232-5

Boman HG, Hultmark D. Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol*. 1987; 41: 103-26

Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 61-92.

Boman HG. Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity? *Scand J Immunol*. 1996 ; 43: 475-82.

Boman HG. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol*. 1998 ; 48: 15-25.

Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*. 2003 Sep; 254: 197-215.

Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Matsumoto K, Saito H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 434-44.

Donald CD, Sun CQ, Lim SD, Macoska J, Cohen C, Amin MB, Young AN, Ganz TA, Marshall FF, Petros JA. Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest*. 2003; 83: 501-5.

Fernandez de Caleyra R, Gonzalez-Pascual B, García-Olmedo F, Carbonero P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. *Appl Microbiol*. 1972; 23: 998-1000.

Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol*. 1986; 60: 1068-74.

Dunsche A, Açı Y, Siebert R, Harder J, Schröder JM, Jepsen S. Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med*. 2001; 30: 154-8.



Dunsche A, Açil Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 121-4.

Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol.* 2004; 137: 379-85.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem.* 1997; 272: 15258-63.

Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol.* 2005; 7: 1387-97.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1985; 76: 1427-35.

Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Pharmacol Ther* 1995; 66: 191-205.

García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 2001a; 306: 257-64.

García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 2001b; 15: 1819-21.

Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell.* 1997; 88: 553-60.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 1997; 387: 861.

Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM. 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; 22: 714-21.

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; 276: 5707-13.

Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol.* 2004; 123:522-9.

Harder J, Gläser R, Schröder JM. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2007;13: 317-38.

Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol.* 2003;120: 379-89.

Henzler-Wildman KA, Martinez GV, Brown MF, Ramamoorthy A. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry.* 2004; 43: 8459-69.

Hoover DM, Chertov O, Lubkowski J. The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. *J Biol Chem.* 2001; 276: 39021-6.

Hoover DM, Wu Z, Tucker K, Lu W, Lubkowski J. Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2804-9.

Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem.* 1980; 106:7-16

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004; 5: 987-95.

Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 23216–25.

Jones DE, Bevins CL. Defensin-6 m-RNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in the host defense of the human bowel. *FEBS Lett* 1993; 315: 187–92.

Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1665-72.

Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L, Ganz T. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol.* 2002; 118: 275-81.

Maisetta G, Batoni G, Esin S, Luperini F, Pardini M, Bottai D, Florio W, Giuca MR, Gabriele M, Campa M. Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with

other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3349-51.

Merrifield RB, Merrifield EL, Juvvadi P, Andreu D, Boman HG. Design and synthesis of antimicrobial peptides. *Ciba Found Symp.* 1994; 186: 5-20;

Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, Yamazaki K, Sayama K, Taubman MA, Kurihara H, Hashimoto K, Sugai M. Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun.* 2003; 71: 3730-9.

Owen SM, Rudolph D, Wang W, Cole AM, Sherman MA, Waring AJ, Lehrer RI, Lal RB. A theta-defensin composed exclusively of D-amino acids is active against HIV-1. *J Pept Res.* 2004; 63: 469-76.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 2004; 6: 1382-7.

Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet.* 2002; 360: 1144-9.

Ouellette AJ. Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment. *Gastroenterology.* 1997; 113: 1779-84.

Rossolini GM, Mantengoli E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 2-8.

Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, Lehrer RI. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J Biol Chem.* 1983; 258: 14485-9.

Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, et al. Enteric defensins. Antibiotic peptide components of intestinal host defence. *J Cell Biol* 1992; 118: 929.

Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, McGuire PA, Novotny MJ, Smith W, Henschen AH, Cullor JS. Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem.* 1993; 268: 6641-8.

Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol.* 2005; 6: 551-7.

Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2002; 66: 236-48.

Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 14961-6.

Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho SM, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006; 66: 8542-9.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005; 17: 1-14.

Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science.* 1999; 286: 498-502.

Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1633-42.

Varoga D, Pufe T, Harder J, Meyer-Hoffert U, Mentlein R, Schröder JM, Petersen WJ, Tillmann BN, Proksch E, Goldring MB, Paulsen FP. Production of endogenous antibiotics in articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3526-34.

Varoga D, Pufe T, Harder J, Schröder JM, Mentlein R, Meyer-Hoffert U, Goldring MB, Tillmann B, Hassenpflug J, Paulsen F. Human beta-defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 1736-45.

Varoga D, Paulsen FP, Kohrs S, Grohmann S, Lippross S, Mentlein R, Tillmann BN, Goldring MB, Besch L, Pufe T. Expression and regulation of human beta-defensin-2 in osteoarthritic cartilage. *J Pathol.* 2006; 209: 166-73.

Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: D933-7.

Warnke PH, Springer IN, Russo PA, Wiltfang J, Essig H, Kosmahl M, Sherry E, Acil Y. Innate immunity in human bone. *Bone.* 2006; 38: 400-8.

Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulègue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 8880-5.

Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol.* 2002; 169: 2516-23.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 1999; 286: 525-8.

Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2000; 68: 9-14.

Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 2002; 23: 291-6.

Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 1995; 374: 1-5.

Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 5449-53.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002; 415: 389-95.

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

Zucht HD, Grabowsky J, Schrader M, Liepke C, Jürgens M, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur J Med Res.* 1998; 3: 315-23.

## 7 Anhang

### 7.1 Publikation

Warnke PH, Russo PA, Hopfenziz M, Kurz B, Becker ST, Sherry E, Springer I, Sivananthan S. Antimicrobial Peptide immunity protects human nasal and auricular cartilage against infection. J Craniofac Surg. 2010 Jan;21(1):198-201.

## 7.2 Votum der Ethik-Kommission

MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn  
PD Dr. Dr. Patrick Warnke  
Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
Arnold-Heller-Straße 16  
24105 Kiel

Schwanenweg 20  
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09  
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum: 03.06.2009

**AZ.: D 411/09** (bitte stets angeben)  
**Studienplan:** **Immunhistochemischer Nachweis der humanen Beta-Defensine -1, -2, -3 in Nasen- und Ohrknorpelgewebe des Menschen**  
Studienplan, Patienteninformation und Einverständniserklärung

**Studienleiter:** **PD Dr. Dr. Patrick Warnke, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, UKSH, Campus Kiel**

**Datum des Antrages:** **29.05./02.06.2009**

Sehr geehrter Herr Kollege Warnke  
vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag.

Nach Durchsicht der Unterlagen durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Es wird darauf hingewiesen, dass künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

*J. Schaub*

Prof. Dr. med. Jürgen Schaub  
Vorsitzender der Ethik-Kommission  
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

### 7.3 Danksagungen

Ich bedanke mich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. Patrick Warnke für die Bereitstellung des Themas, sowie die hilfreiche beratende Tätigkeit bei der Erstellung dieser Dissertationsarbeit.

Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang möchte ich für die Bereitstellung der technischen Mittel und der Räumlichkeiten danken.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Yahya Açil danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der für die Dissertation notwendigen Labortätigkeit.

Desweiteren gehört ein besonderer Dank Herrn Professor Dr. rer. nat. Bodo Kurz vom Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die freundliche Bereitstellung der Gewebeproben aus den Körperspendern.

Für die technische Unterstützung danke ich besonders Frau Gisela Otto, Frau Gabriele Neßenius und Frau Betül Temel.

Abschließend möchte ich ganz besonders meiner Ehefrau Astrid Söth für die Unterstützung und Korrektur danken, sowie meinen Eltern dafür, dass sie mir das Studium der Zahnmedizin ermöglicht haben.



#### **7.4 Selbständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation mit dem Thema:

**IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER  
HUMANEN BETA-DEFENSINE -1, -2, -3  
IN NASEN- UND OHRKNORPELGEWEBE DES MENSCHEN**

abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Martin Hopfenziz-Söth

## 7.5 Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Martin Heinz Hopfenziz-Söth, geb. Hopfenziz

Wohnhaft: Kleiststraße 64, 24118 Kiel

Geboren am: 13. Juli 1981 in Siegen

Staatsbürgerschaft: deutsch

Familienstand: verheiratet mit Astrid Söth, Lehrerin, seit dem 31.07.2009

Eltern:

Dr. Heinz Hopfenziz, Maschinenbauingenieur  
Marita Hopfenziz, Lehrerin

Schulbildung:

1988- 1992 Grundschule Büschergrund bei Freudenberg

1992- 2001 Gymnasium am Löhrtor der Stadt Siegen,  
11. Juni 2001 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

Ersatzdienst: 02. Juli 2001 bis 30. April 2002 als Krankenpflegehelfer im  
Kreiskrankenhaus der Stadt Siegen

Studium:

Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zum  
Wintersemester 2002/2003

Studiengang: Zahnmedizin

02. Juli 2008 Abschluss des Staatsexamens für Zahnmedizin an der Christian-  
Albrechts-Universität zu Kiel

09. Juli 2008 zahnärztliche Approbation

August 2008 Einschreibung zum Studiengang Humanmedizin an der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Berufliche Tätigkeit:

15. Oktober 2008 bis 14. Oktober 2009 als wissenschaftlicher Assistent im  
Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

seit 01. September 2009 als angestellter Zahnarzt und Vorbereitungsassistent in  
der Zahnarztpraxis Thomas Zahorsky in Kiel

Seit 2005 Dissertationsarbeit zum Thema Antimikrobielle Peptide im menschlichen  
Nasen- und Ohrknorpelgewebe in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
in Kiel unter der Leitung von OA PD Dr. Dr. Patrick Warnke