

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Jobst Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE ROLLE DER GLIAZELLEN IN DER FUNKTIONALEN
EXPRESSION DES ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDS
LL37/CATHELICIDIN-RELATED ANTIMICROBIAL PEPTIDE
(CRAMP) IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM DER RATTE**

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

vorgelegt von

NICOLETTA NICOLAEVA

aus Haskovo, Bulgarien

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer
Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2013
Zum Druck genehmigt, Kiel, den
gez.

Gewidmet meiner Großmutter, Dr. med. Stefka Petrova (Fachärztin für Neurologie)!

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
I EINLEITUNG	1
1.1 Antimikrobielle Peptide.....	1
1.1.1 Allgemein	1
1.1.2 Wirkungsweise	1
1.1.3 Defensine.....	2
1.1.4 Cathelizidine.....	3
1.2 Das Gehirn und seine Abwehrmechanismen.....	4
1.3 Ziel der Arbeit	6
II MATERIALIEN.....	7
2.1 Chemikalien.....	7
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	8
2.3 Puffer und Lösungen	8
2.4 Medien und Zusätze der Zellkultur	10
2.5 Stimulanzen und Peptide	10
2.6 Antikörper.....	11
2.7 real-time Reverse Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion.....	12
2.8 gebrauchsfertige Kits.....	12
2.9 Geräte	12
III METHODEN	14
3.1 Zellkultur	14
3.1.1 Kortex- und Mesenzephalonpräparation der Ratte.....	14
3.1.2 Mikrogliegewinnung	14
3.1.3 Astrozytengewinnung.....	15
3.2 Stimulation der Gliazellen.....	16
3.3 RNA-Isolierung und realtime RT-PCR.....	17
3.3.1 Allgemein	17
3.3.2 RNA-Isolierung	18
3.3.3 cDNA-Gewinnung	19
3.3.4 Real time RT-PCR	19
3.4 Western-Blot-Analysen	20
3.4.1 Allgemein	20
3.4.2 Zellyse und Proteinisolierung	20
3.4.3 Proteinbestimmung.....	21
3.4.4 Probenvorbereitung	21
3.4.5 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese und Blot-Verfahren	21
3.4.6 Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe	22
3.4.7 Agar-Plattendiffusionstest.....	22
3.4.8 Immunohistochemische Untersuchungen	23

INHALTSVERZEICHNIS

3.5	ELISA.....	24
3.5.1	Allgemein.....	24
3.5.2	LL-37 ELISA.....	24
3.5.3	HBD-2 und 3 ELISA.....	25
3.5.4	Lysozym ELISA.....	25
3.5.5	Bestimmung der NO-Produktion.....	26
3.6	Datenanalysen.....	26
IV	ERGEBNISSE.....	27
4.1	Nachweis des humanen antimikrobiellen Peptides LL-37 im <i>Liquor cerebrospinalis</i> von Patienten mit bakterieller Meningitis.....	27
4.2	Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität im <i>Liquor cerebrospinalis</i> von Patienten mit bakterieller Meningitis.....	29
4.3	Zunahme der rCRAMP-Expression in primären Astrocyten und Mikroglia-Kulturen aus der Ratte nach Behandlung mit Bakterienüberständen.....	30
4.4	Antimikrobielle Aktivität der Zellkulturüberstände von primären Gliazellen aus der Ratte nach der Stimulation mit den Bakterienüberständen.....	33
4.5	Nachweis der rCRAMP-Immunoreaktivität in einem Rattenmodell für die Pneumokokkenmeningitis.....	34
4.6	Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege durch die Bakterienüberstände in primären Gliazellen aus der Ratte.....	38
4.7	Untersuchungen zur Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege an der rCRAMP-Expression in primären Gliazellen aus der Ratte.....	38
4.8	Induktion der rCRAMP-Expression durch die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und den Tumornekrosefaktor- α (TNF α) in primären Gliazellen.....	40
4.9	Induktion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und des Tumornekrosefaktor- α (TNF α) durch die verschiedenen Bakterienüberstände in primären Gliazellen.....	40
V	DISKUSSION.....	44
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	49
VII	LITERATURVERZEICHNIS.....	50
VIII	ABKÜRZUNGEN.....	54
IX	DANKSAGUNG.....	55
X	LEBENS LAUF.....	56
XI	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	57
XII	POSTERPRÄSENTATIONEN.....	57

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

I EINLEITUNG

1.1 Antimikrobielle Peptide

1.1.1 Allgemein

Der Begriff des „**Peptids**“ wurde 1902 erstmals von Emil Fischer auf der 74. *Jahresversammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte* in Karlsbad geprägt. Der Name ergibt sich aus den Proteinabbauprodukten des Pepsins, **Pepton** (*peptos, griech.: verdaut*) und aus der Endung des Begriffes Polysaccharid, aufgrund der Ähnlichkeit in deren Aufbau aus Monomeren. Im Allgemeinen bestehen alle Peptide aus einer bestimmten relativ kurzen Aminosäuren-Sequenz (Reihenfolge) von bis zu 100 Aminosäuren. In diesem Sinne sind die sogenannten antimikrobiellen Peptide (AP) niedermolekulare Oligo- bis Polypeptide, die in den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts (Zasloff, 1987, Spencer, 1992) bei Krallenfröschen entdeckt wurden und seitdem im Mittelpunkt zahlreicher Studien stehen. Die AP sind evolutionsgeschichtlich sehr alt und kommen überall in der Natur vor – in Pflanzen, Fischen, Insekten. Sie sind ein Teil der entwicklungsgeschichtlich älteren Form der Immunabwehr, nämlich der sog. angeborenen, unspezifischen Immunabwehr. Diese fungiert als erste Immunantwort und wird sowohl beim Menschen, als auch in Säugetieren durch die Abwehrzellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen), das Komplementsystem und verschiedene Peptide und Enzyme repräsentiert. Als ein Teil der angeborenen Immunabwehr fungieren die AP als Entzündungsmediatoren, chemotaktische Faktoren, sowie auch als Induktoren von Blutgefäßneubildung und Wundheilungsprozessen (Yeung et al., 2011). Sie kommen in den Granula von Phagozyten (Ganz, 2003, Zanetti, 2005), in den Epithelzellen der Haut (Frohm et al., 1997), der menschlichen Mundhöhle (Zasloff, 2002), der Vagina, des Respirationstraktes, im Knochenmark, in der Synovialflüssigkeit sowie im Gelenkknorpel vor (Varoga et al., 2005).

1.1.2 Wirkungsweise

Die AP gehören zu der Gruppe der endogenen Antibiotika. Sie können die Mikroorganismen in ihrem Wachstum inhibieren oder sogar direkt abtöten. Sie haben ein breites antimikrobielles Spektrum gegenüber Gram-negativen, Gram-positiven Bakterien, und zum Teil gegenüber Pilzen und lipidumhüllten Viren (Auvynet und Rosenstein, 2009). Zusätzlich zeigen sie einen synergistischen Effekt mit anderen wirtsspezifischen Abwehreffektormolekülen, wie zum Beispiel Lysozym und Laktoferrin (Bals, 2000). Die AP

EINLEITUNG

haben bestimmte Struktureigenschaften, die für ihre Wirkungsweise von enorm großer Bedeutung sind. Sie sind gegenüber negativen Ladungen auf der Oberfläche von Mikroorganismen sehr reaktionsfreudig und gehen insbesondere mit Lipopolysacchariden Interaktionen ein. Die Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Diese Tatsache erklärt die Ergebnisse einiger Studien, die gezeigt haben, dass sich einige Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* am empfindlichsten gegenüber den AP (Byfield et al., 2011, Sochacki et al., 2011) verhalten. Bei diesen Interaktionen entstehen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen AP und den negativ geladenen Molekülen der bakteriellen Zellwand (Brogden, 2005). Der genaue Mechanismus bis zur vollkommenen Lyse des betroffenen Mikroorganismus ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Eine der Theorien geht davon aus, dass mehrere AP zusammen Kanäle in der Zellmembran bilden oder zu unstrukturierten Aggregaten fusionieren, die spontan zur Ausbildung von Poren führen (Wu et al., 1999). Eine weitere Theorie besagt, dass mehrere Peptide großflächig der Bakterienmembran anliegen, was zur Störung der Membranintegrität bis hin zur Porenbildung führt (Scheller et al., 2011). Die Folge daraus ist der Kollaps des Membranpotentials, und die Lyse des fremden Mikroorganismus. Im Allgemeinen unterscheiden sich die AP in der Zusammensetzung der Aminosäuren, in ihrer Größe und Struktur. Jedoch gibt es bisher noch keine einheitliche Klassifizierung, aufgrund deren Vielzahl und der immer wieder neu entdeckten Peptide mit antimikrobieller Aktivität. Bis jetzt wurden zwei Hauptfamilien der antimikrobiellen Peptide in Säugetieren beschrieben, nämlich die Defensine und die Cathelizidine (Zasloff, 2002).

1.1.3 Defensine

Die Defensine sind kationische Peptide mit sechs Cystein-Resten (schwefelhaltige proteinogene α -Aminosäuren), die drei charakteristische intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Je nach dem wie die Cysteine zu Disulfidbrücken verknüpft sind und je nach der allgemeinen molekularen Struktur werden drei Typen von Defensinen unterschieden, nämlich die α -, β - und θ -Defensine (Ganz, 2003). Es wurden insgesamt sechs α -Defensine (1 bis 6) entdeckt, die in verschiedenen Organen vorkommen. Bisher wurden insgesamt vier β -Defensine nachgewiesen, die im Respirationstrakt und vor allem im Knochen und in der Synovialflüssigkeit vorkommen (Varoga et al., 2006). Einige neuere Studien zeigen das Vorkommen des Humanen β -Defensin-1 (HBD-1) im menschlichen, Nagetier- und Schweinegehirn. Für HBD-1 konnte eine konstitutive Expression in Astrozyten, Mikroglia, und meningealen Fibroblasten gezeigt werden, während die Expression von HBD-2 durch

EINLEITUNG

Zytokine als auch Bakterienwandbestandteile in Astrozyten induziert werden konnte (Yan et al., 1996, Lambert et al., 1998, Huttner und Bevins, 1999, Hiratsuka et al., 2001). Der θ -Defensin-Typ ist in Mäusen und beim Menschen nicht bekannt und wurde bisher nur bei Rhesusaffen nachgewiesen (Laporte et al., 2004).

1.1.4 Cathelizidine

Die Familie der Cathelizidine besteht aus einer gut konservierten Cathelin Pro-Region und einer variablen C-terminalen antimikrobiellen Domäne. Die biologisch aktive Domäne der Cathelizidine befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins. Sowohl im murinen als auch im humanen System ist bisher jeweils nur ein Vertreter dieser Familie der AP nachgewiesen worden: das Cathelin-Related Antimicrobial Peptide (CRAMP) bei Mäusen (Gallo et al., 1997), rat-Cathelin-Related Antimicrobial Peptide (rCRAMP) bei Ratten, und das **LL-37** beim Menschen (Sorensen et al., 2001). Das humane Cathelizidin besteht aus insgesamt 37 Aminosäuren und die Sequenz beginnt mit zwei Lysinen. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass auch die Cathelizidin Prosequenz – das Cathelin antimikrobiell wirkt und zusätzlich eine Proteinaseaktivität inhibiert (Zaiou et al., 2003). Allen Cathelizidinen ist gemein, dass sie viele kationische Aminosäuren enthalten, auf ähnlicher Weise eine amphipathische α -Helix bilden und ein ähnliches Wirkungsspektrum aufweisen (Bucki et al., 2010). LL-37 besitzt ein breites antimikrobielles Wirkungsspektrum gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Kai-Larsen und Agerberth, 2008), welches durch einen gewissen Synergismus mit der antimikrobiellen Aktivität der Defensine gekennzeichnet ist (Nagaoka et al., 2000). Zusätzlich besitzt LL-37 auch eine antivirale Aktivität gegenüber dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) Herpes Simplex Virus und Adenovirus (Gordon et al., 2005, Bergman et al., 2007). LL-37 ist sehr resistent gegenüber proteolytischem Zerfall und vermittelt seine chemotaktische Aktivität für Neutrophile Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten wahrscheinlich über den G-Protein gekoppelten Rezeptor FPRL1 (Formyl-Peptid-Rezeptor-like-1; (Yang et al., 2011)). In einigen Studien wurde unter anderem gezeigt, dass Bakterien wie das Gram-negative Bakterium *Salmonella typhimurium*, bakterielle Bestandteile in Form von Lipopolysacchariden (LPS), aber auch Entzündungsprozesse in der Haut die Produktion und Sekretion von LL-37 und CRAMP induzieren können (Frohm et al., 1997, Rosenberger et al., 2004, Bergman et al., 2005).

1.2 Das Gehirn und seine Abwehrmechanismen

Die wichtige Barriere zum Schutz des Gehirns gegen pathogene Mikroorganismen ist die Blut-Hirnschranke (BHS), die eine echte physiologische Barriere zwischen der Blutbahn und dem Zentralnervensystem (ZNS) darstellt. Die Nichtpermeabilität für hydrophile Substanzen und Partikeln größer als 20 nm liegt an den besonders dichten Zellkontakten (den sog. *Tight junctions*, *Zonula occludens*) zwischen den Endothelzellen der Kapillarwände. Neben der BHS stellt die Blut-Liquor-Schranke (BLS) eine weitere Barriere im Gehirn zwischen dem Blutkreislauf und dem Liquorsystem dar. Sie wird durch die Kapillarendothelzellen, die darunter liegende Basalmembran und das Plexusepithel gebildet. Sie ist nur vollständig für Wasser und gelöste Gase wie Sauerstoff und Kohlendioxid durchlässig, kaum durchlässig für Elektrolyte und für die meisten übrigen Moleküle gänzlich undurchlässig. Diese können die BLS nur überwinden, wenn sie durch die Plexusepithelien aktiv hindurchgeschleust werden (Redzic, 2011). Die Abwehr des ZNS gegenüber pathogenen Mikroorganismen findet vorwiegend im Bereich der Endothelzellen der BHS statt (Kim, 2003). An der Ausbildung der Zellkontakte und somit Bildung der BHS sind Astrozyten als wichtigste Vertreter der Makroglia beteiligt. Sie stellen den Großteil der Masse des Gehirns und gehören zu den Gliazellen (aus dem griech. „*Leim*“). Neben der wichtigen Funktion für den Aufbau und die Bewahrung der Integrität der BHS und BLS, versorgen sie Neurone mit Nährstoffen, ermöglichen die schnelle Signalweiterleitung, nehmen freigesetzte Botenstoffe auf und sind an der Immunabwehr des Zentralnervensystems beteiligt. Dem zu Folge spielen sie eine wichtige Rolle in der Erkennung von Pathogenen, welche über den Blutkreislauf ins ZNS gelangen (Bechmann et al., 2007).

Weiterhin stellen die Mikroglia-Zellen die Immunzellen des Gehirns dar. Sie enthalten hydrolytische Enzyme und sind dadurch in der Lage, untergegangene Nervenzellen und Nervenzellfortsätze zu phagozytieren. Sie entstammen dem monozytären Phagozytensystem und sind daher als spezialisierte, ortsständige, zentralnervöse Makrophagen anzusehen (Kofler und Wiley, 2011).

Für die Erkennung der pathogenen Erreger sind sogenannte Muster-Wiedererkennungs-Rezeptoren verantwortlich, nach deren Aktivierung die angeborenen Abwehrmechanismen einschließlich einer Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und einer Zunahme der AP-Konzentration auslöst werden (Konat et al., 2006, Su et al., 2010). Zu den Muster-Wiedererkennungs-Rezeptoren werden unter anderem die *Toll-like* Rezeptoren gezählt. Sie sind in der Lage eine Vielzahl an strukturell hoch konservierten Motiven von mikrobiellen

EINLEITUNG

Pathogenen, welche als Pathogen-assoziierte Molekülmuster (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)) bezeichnet werden, von körpereigenen Molekülen zu unterscheiden (Kopp und Medzhitov, 1999, Kumar et al., 2011). Auf Grund von phylogenetischen Analysen auf molekularbiologischer Basis wurden bereits sechs Familien der Toll-like Rezeptoren identifiziert (Roach et al., 2005), wobei jede einzelne auf die Bindung einer bestimmten Klasse von PAMPs spezialisiert ist (Lien und Ingalls, 2002).

Das Gehirn wird weiterhin durch *Liquor cerebrospinalis* (LCS) umgeben. LCS dient der Abpolsterung des Gehirns und Rückenmarks und wird durch den *Plexus choroideus* in den Ventrikeln gebildet. In unmittelbarer Nähe zum Liquorsystem stehen die Hirnhäute, die sogenannten Meningen. Kommt es zu einem Eindringen von Keimen in den Liquorraum kann dies zu einer Entzündung der Meningen führen, der sogenannten Meningitis (Saez-Llorens und McCracken, 2003). Die Erkrankung wird durch Viren, Bakterien oder andere Mikroorganismen verursacht (Ginsberg, 2004). An der Meningitis erkrankte Patienten weisen grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Übelkeit und Erbrechen auf. Des Weiteren können verstärkte Empfindlichkeit gegenüber Lärm und Licht sowie Versteifungen des Nackenbereiches, Rückenschmerzen und dermale Ausschläge auftreten (van de Beek et al., 2004). Die bakterielle Meningitis erfordert antibiotische Behandlung und kann trotz frühzeitiger Diagnose zu irreparablen Hirn- und Hirnnervenschäden führen. Als Spätfolgen können weiterhin Hör- und Verhaltensstörungen zurückbleiben. Ohne medikamentöse Therapie oder bei zu später Diagnose verläuft die Erkrankung letal (Tunkel et al., 2004). Grundsätzlich gibt es drei Infektionswege. Entweder erreichen die Erreger das ZNS über die Blutbahn, über angrenzende Strukturen wie zum Beispiel das Mittelohr oder direkt nach offenen Schädeltraumata. Nachdem die Bakterien in den Blutkreislauf eingedrungen sind, müssen sie die Blut-Hirn-Schranke (BHS) des ZNS überwinden um in den Liquorraum zu gelangen. Die Pathogene benutzen verschiedene Mechanismen zur Überwindung der Endothelschicht, wobei inflammatorische Prozesse eine wesentliche Rolle spielen (Weiss et al., 2009). Im Liquorraum finden die Bakterien optimale Wachstumsbedingungen vor, so dass sich diese auch aufgrund der nur unzureichenden Immunabwehr massiv vermehren können (Ransohoff et al., 2003). Bei ansteigender Bakterienkonzentration erhöht sich die Freisetzung bakterieller Bestandteile im Liquor. Dies führt zur lokalen Aktivierung ortsansässiger Immunzellen, die bestimmte proinflammatorische Zytokine produzieren (van Deuren et al., 2000). Die im Subarachnoidalspalt entstehende Entzündungsreaktion resultiert letztendlich aus der Immunantwort als Folge der bakteriellen Infektion (Saez-Llorens und McCracken, 2003).

1.3 Ziel der Arbeit

Insgesamt ist die Suche nach neuen Therapieansätzen essentiell, um die Sterblichkeit nach einer Meningitis zu senken und mögliche Folgeschäden zu reduzieren und zu verhindern. Hierbei können Erkenntnisse zu den AP einen wichtigen Beitrag liefern. Das Thema der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Expression und Funktion der AP im ZNS. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Können im LCS und Serum AP nachgewiesen werden?
- Besitzt LCS eine antimikrobielle Aktivität? Sind daran AP beteiligt?
- Welchen Anteil besitzen die Gliazellen an der Expression und Sekretion von AP?
- Besitzen die Überstände von Gliazellen eine antimikrobielle Aktivität? Sind daran AP beteiligt?
- Welche Signaltransduktionswege in den Gliazellen sind an der Expression der AP beteiligt?

MATERIALIEN

II MATERIALIEN

Reinstwasser wurde durch Umkehrosiose mit dem Milli-Q® Plus 10 Water System (Millipore, Eschborn) gewonnen.

2.1 Chemikalien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Amoniumpersulfat (APS)	Biomol Feinchemikalien,
Hamburg	
Amphotericin B	Sigma Aldrich, Deutschland
Bicine	Carl Roth, Karlsruhe
bisBenzimid	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Fluka, Schweiz
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie® Brilliant Blue 250	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol (Für Analyse)	KMF Laborchemie, Lohmar
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycerol	Serva Electrophoresis, Heidelberg
β-Glycerophosphat	AppliChem, Darmstadt
Glycogen	Sigma Aldrich, Steinheim
Hepes	Carl Roth, Karlsruhe
Immu-Mount,	Eindeckmedium Thermo Electron, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenheim
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrat (NaNO ₂)	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumvanadat	Sigma Aldrich, Steinheim
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Salzsäure (HCl) (1N)	Merck, Darmstadt
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin 5 %	Invitrogen, Karlsruhe

MATERIALIEN

Trypsin	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween ® 20	Serva, Heidelberg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.2 Verbrauchsmaterialien

15ml und 50ml Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
96-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen
Amersham Hyperfilm™	GE Healthcare, München
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
8er PCR-Strips	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen	G.Kisker-Products, Steinfurt
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore, Eschborn
MicroAmp™ Optica Adhesive Film	Applied Biosystems, USA
Objekträger	Paul Marienfeld, Lauda- Königshofen
Deckgläschen	Gaudig, Osterweddingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Rotilabo®-Blottingpapiere	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturplatten, 6 Vertiefungen	Biochrom, Berlin
Zellschaber 24cm	Techno Plastic Products, Schweiz

Ferner das übliche Laborzubehör und Glasverbrauchsmaterial

2.3 Puffer und Lösungen

Die angegebenen pH-Werte der einzelnen Puffer und Lösungen wurden mittels pH-Meter durch die Zugabe von 1N HCl oder 1N NaOH eingestellt.

Blockierungspuffer:

5 % Milchpulver gelöst in Tris Puffer Salin-Tween 20 (TBS-T)

Coomassie-Färberlösung:

1 g Coomassie
125 ml Ethanol
100 ml Natriumacetat
Auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt

Dissoziationslösung:

24 mg Hepes
20 mg Trypsin
2 mg EDTA
In 10 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Entfärberlösung:

250 ml Ethanol
200 ml Natriumacetat

MATERIALIEN

Auf 2 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt

Gelpuffer 1:

45,43 g Tris

1 g SDS

Auf 250 ml mit destilliertem Aqua aufgefüllt

pH 8,8

Gelpuffer 2:

15,1 g Tris

1 g SDS

Auf 250 ml mit destilliertem Aqua aufgefüllt

pH 6,8

Griess-Reagenz zur NO-Bestimmung (Sigma, Deutschland):

0,5% Sulfanilamid

0,05% Naphtylethylenamin-Dichlorid

in 0,25% Phosphorsäure

Laufpuffer (nach Pierce):

121 g Tris

238 g HEPES

10 g SDS

Auf 2 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt

pH 8,0

Lysispuffer:

0,5 ml Tris pH 7,5

0,5 ml NaCl

50 µl EDTA

50 µl Triton X

2 mM Natriumvanadat

2,5 mM Natriumpyrophosphat

1 mM β-Glycerolphosphat

1 mM PMSF

3,665 ml destilliertes Wasser

PBS-Puffer:

9,55 g Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt

pH 7,4

Probenpuffer:

1,5 ml SDS

0,5 ml β-Mercaptoethanol

2 ml Glycerol

1 ml Bromphenolblau (0,1 %)

5 ml Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)

Stopplösung:

50 mM EDTA in destilliertem Wasser

Strippingpuffer:

20 g SDS

125 ml Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)

8 ml β-Mercaptoethanol

Auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt

Tris-HCl-Puffer:

6,1 g Tris

37 ml 1 N HCl

MATERIALIEN

Auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt
pH 7,6

TBST:

12 g Tris
41 g NaCl
10 ml EDTA (0,5 M)
5 ml Tween 20
Auf 5 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt
pH 7,5

Transferpuffer (nach Pierce):

6 g Tris
8,16 g Bicine
200 ml Ethanol
Auf 2 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt

Zitronensäurepuffer:

2,1 g Zitronensäure
Auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt
pH 6,0

2.4 Medien und Zusätze der Zellkultur

Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)
OptiMEM® I
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Fötale Kälber Serum (FKS)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)
Amphotericin B
5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FDU)

PAA Laboratories, Österreich
Invitrogen, Karlsruhe
PAA Laboratories, Österreich
Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen, Karlsruhe

2.5 Stimulanzien und Peptide

Name:	Inhibitor für:	Verwendete Konzentration	Hersteller
PD 98059 (2-Amino 3-Metoxyflavon)	MAPK/ERK	10 µM	Calbiochem, NJ, USA
SB 203580 (4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]pyridine)	p38 MAPK	10 µM	Calbiochem, NJ, USA
L-NMMA (N-Monomethyl-L-Arginin)	iNOS	100 µM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
CAPE (Kaffeesäure-Phenylethylester)	NFκB	1 µM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

MATERIALIEN

Verwendete Peptide für ELISA

- Humanes rekombinantes LL-37 (Innovagen, Sweden)
- Humanes rekombinantes HBD-2 (PeproTec, Rocky Hill, USA)
- Humanes rekombinantes HBD-3 (wurde freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Jürgen Harder. Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK-SH), Campus Kiel bereitgestellt)

2.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti-LL-37	0,5 µg/ml	Innovagen, Sweden
Biotinylierter Kaninchen anti-LL-37	0,2 µg/ml	Innovagen, Sweden
Ziege anti-HBD-2	0,5 µg/ml	Acris, Hiddenhausen
Biotinylierter Kaninchen anti-HBD-2	0,2 µg/ml	Acris, Hiddenhausen
Kaninchen anti-HBD-3	1 µg/ml	Tebu Bio, Offenbach
Biotinylierter Kaninchen anti-HBD-3	0,5 µg/ml	Tebu Bio, Offenbach
Ziege anti-rCRAMP	1:100	Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-GFAP	1:250	Abcam, UK
Maus anti-OX-42	1:200	Sera-Lab, England
Kaninchen anti-GAPDH	1:250	Santa Cruz, USA
Maus anti-pERK1/2	1:500	Santa Cruz, USA
Maus anti-ERK2	1:500	Santa Cruz, USA

Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Hersteller
Esel anti-Ziege AlexaFluor 488	1:250	Molecular Probes, USA
Ziege anti-Kaninchen Cy3	1:250	Sigma, Deutschland
Maus anti-Kaninchen Cy3	1:250	Sigma, Deutschland
Peroxidase-gekoppelter anti-Maus	1:20.000	Sigma, Deutschland
Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen	1:20.000	Sigma, Deutschland
Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin	1:10.000	Roche Diagnostics, Mannheim

MATERIALIEN

2.7 real-time Reverse Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion

RQ1 RNase-Free DNase-Kit	Promega, USA
RevertAid™ H Minus M-MuLV	Fermentas, St. Leon-Rot
	Reverse Transcriptase
	Fermentas, St. Leon-Rot
Reaction Buffer for M-MuLV-RT (5x)	Amersham, Freiburg
pd(N)6 Sodium Salt (Random Hexamer)	Bioline, Luckenwalde
dNTP Mix (2.5 mM pro NTP)	Applied Biosystems, USA
SYBR® Green PCR Master Mix	

Verwendete Primer für die Ratte

Name	Sequenz	Hersteller
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	Vorwärts-Primer: TCTACCCACGGCAAGTTCAAC Rückwärts-Primer: TCTCGCTCCTGGAAGATGGT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
18s	TaqMan-Primer	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
rCRAMP	QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
IL-1 β	TaqMan-Primer	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
TNF- α	TaqMan-Primer	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

2.8 gebrauchsfertige Kits

peqGOLD TriFast™ Kit	PeqLab, Erlangen
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore, Eschborn
BCATM protein assay Kit	Thermo Scientific, USA
Lysozym ELISA Kit	Immundiagnostik, Bensheim, Germany

2.9 Geräte

Hypercassette	Amersham Bioscience, UK
ABI Prism 7000	Life Technologies, Deutschland
2720 Thermal Cycler	Life Technologies, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Universal Hybridisierungsofen BFD S3	WTB Binder, Tuttlingen
Universal 32 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
BBD 6220	Heraeus, Hanau
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-RAD Laboratories, München
Thermomixer compact	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Mini-PROTEAN® Tetra-Cell	Bio-RAD Laboratories, München

MATERIALIEN

Power PAC™ HC
Mikroskop DM IL
Infinite® M200
Nano Drop 1000 Spectrophotometer
Neubauer Zählkammer

Bio-RAD Laboratories, München
Leica, Wetzlar
Tecan, Schweiz
PeqLab, Erlangen
Labor Optik, Friedrichsdorf

METHODEN

III METHODEN

3.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurde Gliazellen aus den Gehirnen von zwei Tage alten Wistar-Ratten gewonnen. Die Tiere stammten aus der Zucht des Viktor-Hensen-Tierhauses der vorklinischen Institute der Universität Kiel. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte dabei bei 37°C und 5% Kohlendioxid. Als Kultivierungsmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) eingesetzt, welches für Mikroglia und Astrozyten mit den entsprechenden Zusätzen versehen wurde.

3.1.1 Kortex- und Mesenzephalonpräparation der Ratte

Nach der Dekapitation wurden die Gehirne präpariert und die beiden Kortexhälften und das Mesenzephalon vom Rest des Gehirnes getrennt. Nach dem Entfernen der Meningen, wurden die Kortexhälften und das Mesenzephalon getrennt voneinander in Dulbecco's Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gesammelt und dreimal mit diesem gespült. Anschließend wurden die Gewebeteilchen in einer 10 cm Zellkulturschale zerkleinert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1500 U/min wurde das PBS vorsichtig abgesaugt und sich am Boden befindliche Gewebestücke mit Dissoziationslösung versetzt. Pro vier bis fünf Kortexhälften beziehungsweise Mesenzephalon wurden 3 ml der Dissoziationslösung eingesetzt. Zudem wurden zu je 3 mL Dissoziationslösung 35 µl DNase hinzugefügt. Nach kurzem Aufschütteln erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C. Während dieser sollten die Gewebeteilchen nach 15 Minuten nochmals aufgeschüttelt werden. Nachfolgend wurde wieder für fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und die Dissoziationslösung mit der DNase abgesaugt. Die Gewebeteilchen wurden nun mit 2 ml DMEM, welches 10 % fötales Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin-Streptomycinlösung (Pen/Strep) enthielt, und 50 µl DNase versetzt und mit Hilfe einer Pipette dissoziiert. Abschließend wurden die Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät und mit dem entsprechenden Medium aufgefüllt.

3.1.2 Mikrogliaengewinnung

Als grundlegendes Medium zur dauerhaften Kultivierung von Mikroglia diente das DMEM. Dieses wurde mit 10% FKS, welches bei 44°C bis 53°C inaktiviert wurde, und 1% Pen/Strep versetzt. Zur Gewinnung von Mikroglia wurden die Zellen aus den Kortexhälften und den

METHODEN

Mesenzephalien in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und mit 10 ml Medium versorgt. Dabei wurden pro 75 cm² Flasche ungefähr vier Kortexhälften oder fünf Mesenzephalien eingesetzt. Die Kultivierung der beiden Gehirnteile erfolgt im Gegensatz zur Ernte getrennt. Nach der Aussaat wurde zunächst eine Woche lang jeden Tag das Medium gewechselt, indem das verbrauchte Medium mit einer serologischen Pipette steril abgesaugt wurde und 10 ml neues Medium hinzugefügt wurde. Danach erfolgte die Reinkubation im Brutschrank. Sobald der Boden der Kulturflaschen dicht mit Zellen bewachsen war, konnten die Zellen geerntet werden. Die kultivierten Zellen aus den Kortexhälften und dem Mesenzephalus wurden dabei gemeinsam geerntet. Das sich in den Flaschen befindliche Medium wurde zusammen in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1500 U/m zentrifugiert, wodurch die Mikroglia pelletiert wurden. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgesaugt und das Pellet in 1 bis 5 ml DMEM mit 10% FKS (Inaktivierung bei 56°C) und 1% Pen/Strep resuspendiert. Dies erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Mediums mittels der Pipette, so dass sich die Zellen vereinzeln. In einem 1 ml Reaktionsgefäß wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung versetzt, welches die toten Zellen blau markierte. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer konnten die Zellen gezählt und die Dichte der Zellsuspension bestimmt werden. Die geernteten Mikroglia wurden in einer Zellkulturplatte mit zwölf Vertiefungen kultiviert, wobei je Vertiefung zwischen 7x10⁵ und 10⁶ Zellen ausgesät wurden. Jede Vertiefung wurde auf 1 ml DMEM mit 10% FKS 56°C und 1% Pen/Strep aufgefüllt. Nach ein bis zwei Tagen konnten die Zellen stimuliert werden. Die 75 cm² Kulturflaschen wurden wieder mit 10 ml neuem Medium gefüllt und zurück in den Inkubator gestellt.

3.1.3 Astrozytengewinnung

Grundlage für die Kultivierung bildete das DMEM, welchem 10% FKS und 1% Pen/Strep zugesetzt wurden. Die Inaktivierung des FKS erfolgte bei 56°C. Für die Astrozytengewinnung wurden die Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Hierbei wurden pro Flasche ein bis eineinhalb Kortexhälften eingesetzt. Die Flaschen wurden mit 5 mL Medium aufgefüllt. Die nächsten neun Tage wurden die Zellen jeden zweiten Tag mit Amphotericin B, welches 1:1000 mit Medium verdünnt wurde, versorgt, indem das verbrauchte Medium mit einer Pipette steril abgesaugt und 5 ml des mit Amphotericin B versetzten Mediums hinzugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt, um Mikroglia und andere kontaminierende Zellen zu entfernen. Ein über den anderen Tag wurde das Medium erneut in gleicher Weise gewechselt, welches

METHODEN

diesmal 1:1000 verdünntes 5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FDU) enthielt. Dieser Zusatz verhinderte das weitere Wachstum von Oligodendrozyten. Nachdem wie oben beschrieben eine reine Astrozytenkultur erstellt wurde, konnte diese subkultiviert werden. Zuerst wurde das Medium der Flaschen mittels einer Pipette steril abgesaugt und jede Flasche mit 5 mL PBS durchspült, um jegliche Überreste des alten Mediums zu entfernen. Durch die Zugabe von je 500 µl 5% Trypsin und einer Inkubation für fünf Minuten bei 37 °C, wurden die Zellen vom Boden gelöst. Mit je 2 ml DMEM mit 10% FKS 56 °C und 1% Pen/Strep wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in ein gemeinsames 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1500 U/m, wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in DMEM mit 10% FKS 56°C resuspendiert. Dabei wurden für je drei Zellkulturflaschen zusammengefaßt. Die Zellsuspension wurden auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und wiederum für zehn Minuten bei 37°C inkubiert, wodurch mögliche Mikroglia am Boden adhärirten. Die Astrozyten schwammen derweil noch im Medium, welches wiederum aus den Zellkulturschalen in ein gemeinsames 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Nachdem für fünf Minuten bei 700 U/m zentrifugiert, der Überstand wieder abgesaugt und das Pellet erneut in 10 ml je drei Zellkulturflaschen gelöst wurde, erfolgte die Bestimmung der Dichte der Zellsuspension nach folgendem Ablauf. In einem 1 ml Reaktionsgefäß wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung versetzt, welches die toten Zellen blau färbte, so dass die lebenden Zellen von diesen trennbar waren. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer konnten die Zellen gezählt und die Dichte der Zellsuspension bestimmt werden. Die Astrozyten wurden ebenfalls in einer Zellkulturplatte mit zwölf Vertiefungen ausgesät, wobei die Dichte der Zellen pro Vertiefung $1,4 \times 10^5$ betrug. Nach einer Woche konnten die Zellen stimuliert werden.

3.2 Stimulation der Gliazellen

Die Durchführung der Zellstimulation lief für alle Versuche gleich ab. Die gewünschte Zelldichte wurde auf Zellkulturplatten ausgesät und noch einige Tage unter Standardbedingung weiterkultiviert. Die Bakterienüberstände wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Rainer Podschun (Institut für Infektionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt. Die isolierten Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte von 1 kultiviert und anschließend sterilfiltriert. Dabei sind *Neissera meningitidis* (NM) und *Pseudomonas aeruginosa* (PA) Gram-negative und *Staphylococcus aureus* (SA) und *Streptococcus pneumoniae* (SP) Gram-positive Bakterien.

METHODEN

Die Überstände von NM und SA wurden für die Behandlungen 1:200 und von PA und SP 1:100 verdünnt eingesetzt.

3.3 RNA-Isolierung und realtime RT-PCR

3.3.1 Allgemein

Die Reverse Transkriptase-Polymerasen-Kettenreaktion ist eine Methode mit deren Hilfe der Nachweis der Genexpression bestimmter spezifischer Gene erfolgt. Dabei wird zuerst das Enzym Reverse Transkriptase (*RNA-abhängige-DNA-Polymerase*) verwendet, (in diesem Fall die *Reverse Transkriptase des Moloney-Murine-Leukämie-Virus (MMLV)*), welches die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA katalysiert. Im Anschluss an die Reverse Transkriptase-Reaktion wird mit Hilfe einer Taq-Polymerase (DNA-Polymerase) die entsprechende DNA in einer Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt.

Die *realtime* RT-PCR beruht dabei auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, ermöglicht aber zusätzlich eine Quantifizierung des entstehenden DNA-Produktes. Dem PCR-Ansatz wird dafür ein Fluoreszenzfarbstoff namens SYBR Green zugegeben, welcher mit der doppelsträngigen DNA interkaliert, die dadurch fluoresziert. Durch die Messung der Fluoreszenz erfolgt die Quantifizierung, da die Menge der DNA proportional zur gemessenen Fluoreszenz ist. Für eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung werden die Eigenschaften den sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) ausgenutzt. Ein Donor-Fluorochrom (Reporter), welches durch eine Lichtquelle angeregt wird, gibt einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) ab. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die TaqMan-Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Die eingesetzten sequenzspezifischen Primer sind komplementär zu einem spezifischen DNA-Abschnitt und können mit diesem hybridisieren. Sie dienen als Startpunkt der Polymerase, welche aus Desoxynukleotiden einen zur DNA komplementären Strang synthetisiert.

METHODEN

3.3.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Ribonukleinsäuren (RNA) wurde nach dem Protokoll des peqGOLD TriFast™ Kits durchgeführt. Um aus den stimulierten Zellen die RNA zu isolieren, wurden diese mit peqGOLD TriFast lysiert. Dabei wurden je Vertiefung der Zellkulturplatte 500 µl eingesetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers homogenisiert und nach mehrmaligen Spülen mit der Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur, erfolgte die Zugabe von je 4,7 µl Glycogen, welches durch seine RNA-Trägereigenschaften das später entstandene RNA-Präzipitat weiß färbte und somit dessen Sichtbarkeit verbesserte. Des Weiteren wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Bevor die Proben für 15 Minuten bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert wurden, mussten diese noch für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden.

Nach der Zentrifugation war eine deutliche Phasentrennung zu erkennen. Im unteren Teil befand sich die rote Phenol-Chloroformphase, in der Mitte die Interphase und im oberen Teil die wässrige Phase, in der die zu isolierende RNA enthalten war. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und jede Probe wurde mit 250 µl Isopropanol versetzt. Nach kräftigem Schütteln der Proben, wurden diese ein weiteres Mal für zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Minuten lang bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Durch seine Hydrophilie entzog das Isopropanol der RNA die Hydrathülle, welche folglich ausfiel und durch die Zentrifugation als Pellet mit gelartiger Konsistenz an der unteren Seite des Röhrchens vorzufinden war. Der Isopropanol-Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit je 1 ml 75 % Ethanol und anschließender Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C gewaschen. Nach der Zugabe des Ethanols erfolgte ein kurzes Schütteln, damit sich das Pellet wieder vom Boden löste und von möglichen Isopropanol-Rückständen befreit wurde.

Nachdem der Ethanol-Überstand so gut wie möglich entfernt wurde und das Pellet an der Luft getrocknet ist, wurde dieses mit 20 µl RNase freiem Wasser versetzt. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette wurde das Pellet im Wasser gelöst. Danach wurden die Proben noch für zehn Minuten auf 55-60 °C erhitzt, welches die Löslichkeit verbessern sollte. Abschließend konnte die RNA-Konzentration der einzelnen Proben mittels des Nano Drop 1000 gemessen werden. Die isolierte RNA konnte nun bei -70 °C aufbewahrt werden.

METHODEN

3.3.3 cDNA-Gewinnung

Die zuvor isolierte RNA wurde durch Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, kurz RT-PCR, zu *copy* DNA (cDNA) umgeschrieben. Alle Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt. Maximal 1 µg RNA wurde in einem Volumen von 10 µl RNase freiem Wasser gelöst und 2 µl RANDOM HEXAMER hinzugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 70°C inkubiert. Der RANDOM HEXAMER diente als Primer für die Reverse Transkriptase. Ein Mastermix aus jeweils 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl RNase freiem Wasser wurde angesetzt und zu den Proben gegeben. Es folgte eine Inkubation für fünf Minuten bei 25°C. Anschließend wurden die Proben mit 1µl Reverse Transkriptase versetzt und wie folgt inkubiert:

10 Minuten bei 25°C

60 Minuten bei 42°C

10 Minuten bei 70°C

Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.4 Real time RT-PCR

Die cDNA wurde anschließend für die **SYBR Green-** (für die Analyse der rCRAMP-Expression) und **TaqMan RT-PCR** (für die Analyse der IL-1β- und TNF-α-Expression) weiterverwendet. Folgende Ansätze pro Probe wurden pipettiert:

Für rCRAMP als Zielgen:

- 12,5 µl 2x SYBR Green PCR-Mastermix
- 5 µl 10x QuantiTect Primer Assay
- 7,5 µl RNase freies Bidest

Als endogene Kontrolle für die SYBR Green *realtime* RT-PCR wurde GAPDH verwendet:

- 12,5 µl 2x SYBR Green PCR-Mastermix
- 1,5 µl GAPDH-Primer vorwärts
- 1,5 µl GAPDH-Primer rückwärts
- 10µl RNase freies Bidest

METHODEN

Für TaqMan *realtime* RT-PCR:

- 10 µl 2x TaqMan PCR Mastermix
- 1 µl TaqMan® Gene Expression Assay
- 5µl RNase freies Bidest

Alle Proben wurden in einer Doppelbestimmung analysiert. Die eingesetzte cDNA wurde dafür 1:20 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und jeweils 4µl cDNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen jeder Vertiefung betrug abschließend 25 beziehungsweise 20 µl. Die Durchführung der *realtime* RT-PCR erfolgte mittels des StepOnePlus *realtime* RT-PCR System, welches die Proben nach folgendem Ablauf inkubierte. Zuerst wurden die Proben für 15 Sekunden auf 95°C erhitzt, wodurch die DNA denaturiert wurde. Im zweiten Schritt wurde die Temperatur auf die bestimmte Anlagerungstemperatur der Primer herabgesetzt, so dass diese an die DNA-Stränge binden konnten. Im Anschluss wurde für 30 Sekunden auf 72°C erhitzt, während dessen die DNA-Taq-Polymerase den komplementären Strang neu synthetisierte. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen, wobei am Anfang für 15 Minuten denaturiert und nach dem letzten Zyklus für sieben Minuten elongiert wurde. Für die Analyse wurde ein Mittelwert von beiden Ansätzen je Probe erstellt und die Expression des Zielgens auf die Expression der endogenen Kontrolle bezogen.

3.4 Western-Blot-Analysen

3.4.1 Allgemein

Die Methode stellt den Transfer von Proteinen aufgrund der elektrischen Ladung auf eine Trägermembran dar, welche anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert werden können. Vorher wird das Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix (Polyacrylamid-Gel) entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Die Proteinbanden werden auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert.

3.4.2 Zellyse und Proteinisolierung

Die Proteine der stimulierten Gliazellen wurden durch direkte Lyse der Zellen mit Lysispuffer isoliert. Nachdem die Stimulation beendet war, wurde das Medium aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte entfernt und die Zellen vorsichtig mit 1 ml kaltem PBS gespült. Durch die Zugabe von 100 µl Lysispuffer wurden die Zellen lysiert und mit Hilfe eines Zellschabers

METHODEN

homogenisiert. Die Bearbeitung wurde auf Eis durchgeführt, um die Aktivität von Phosphatasen zu senken und die Proteinausbeute zu steigern.

3.4.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben wurde mittels des Bicinchoninsäure-Assays bestimmt. Die Methode beruht auf der Reduktion von Kupfer²⁺ zu Kupfer⁺ durch die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Cystein, welche einen Komplex mit der Bicinchoninsäure bilden. Die Messung des Absorptionskoeffizienten erfolgt bei 562 nm im Photometer. Je mehr Kupfer reduziert wird, desto größer ist die Absorption. Neben den isolierten Proteinextrakten wurden neun Standardlösungen mit verschiedenen Proteingehalten gemessen, welche zur Erstellung der Eichgeraden dienten. Anhand dieser konnten die Proteingehalte der Proben ermittelt werden. Zur Proteinbestimmung wurde das BCA-Protein-Assay-Kit verwendet. Der Versuch wurde in einer 96er-Zellkulturplatte durchgeführt, wobei für jeden Standard und jede Probe eine Doppelbestimmung erfolgte. Dabei wurden zu 10 µl Probe je 200 µl der Bicinchoninsäure-Kupfersulfatlösung hinzugefügt. Die Kupfersulfatlösung wurde dazu 1:50 mit der Bicinchoninsäure verdünnt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss, wurden die einzelnen Absorptionsspektren mit Hilfe des Infinite® M200 gemessen.

3.4.4 Probenvorbereitung

Für die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden das Protein in der entsprechenden Menge Probenpuffer eingesetzt und anschließend für fünf Minuten bei 96°C erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene SDS gehört zu der Gruppe der stark anionischen Detergenzien. Es umhüllt die Proteine und führt zu einer einheitlichen negativen Oberflächenladung jedes Proteins, so dass eine reine Auftrennung nach Molekulargewicht möglich ist. Durch das Erhitzen werden die Proteine denaturiert, wodurch die Anlagerung des SDS erleichtert wird. Damit ebenfalls die Disulfidbrücken der Sekundärstruktur aufgebrochen werden, ist β-Mercaptoethanol ein weiterer Bestandteil des Probenpuffers.

3.4.5 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese und Blot-Verfahren

Die Proben wurden auf ein diskontinuierliches Acrylamid-Gel aufgetragen. Dabei passierten

METHODEN

die Proteine zuerst ein Sammelgel mit niedrigerem Acrylamid-Anteil. Dieses Gel trug dazu bei, die Banden zu fokussieren. Danach wanderten die Proteine in das Trenngel ein, welches einen höheren Vernetzungsgrad aufwies. Die Auftrennung erfolgte für 30 Minuten bei 125 mA. Nach vollständiger Auftrennung des Proteingemisches wurden die Proteinbanden auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Aufbau erfolgte nach dem Semi-Dry-Blot-Verfahren. Zwei Lagen Wattman-Pappe wurden auf eine Elektrodenplatte plaziert. Darauf wurde die zuvor mit Methanol aktivierte Membran gelegt und darauf das Acrylamid-Gel. Bevor die obere Elektrodenplatte aufgelegt wurde, wurden noch zwei weitere Lagen Wattman-Pappe hinzugefügt. Das Blotten erfolgte für 1,15 Stunden bei 240 mV. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 5%iger Milchpulver-Lösung geschwenkt. Dieser Schritt diente dem Blockieren von unspezifischen Bindestellen für die folgende Immunreaktion. Nach Waschen im TBST-Puffer wurde die Membran mit dem primären Antikörper beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten ein weiterer Waschschrift mit TBST-Puffer und die Zugabe des sekundären Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der sekundäre Antikörper ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, wodurch der Komplex mit Hilfe eines Chemilumineszenz-System detektiert werden konnte.

3.4.6 Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe

Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Kits. Die Chemilumineszenz entsteht durch die Peroxidase-katalysierte Oxidation des Luminols, welches eines der Inhaltsstoffe der ersten Lösung ist. Das in der zweiten Lösung enthaltene Wasserstoffperoxid dient der Peroxidase als Substrat. Bei der Oxidation wechseln Elektronen von einem angeregten Zustand in einen energetisch niederen Zustand. Die Folge dessen ist die Emission von Licht. Die Membran wurde mit einem 1:2 Gemisch der beiden Detektionslösungen für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die entstandene Chemilumineszenz konnte anschließend mit ECL-empfindlichen Filmen sichtbar gemacht werden.

3.4.7 Agar-Plattendiffusionstest

Um die antimikrobielle Aktivität des *Liquor cerebrospinalis* und der Zellkulturüberstände nachzuweisen, wurde der Agar-Plattendiffusionstest verwendet. Dazu wurde 10 ml unterliegender Agar (1% Agarose; 0,02% Tween20; 1% Tryptic soy broth; 0,01M Phosphatpuffer) zusammen jeweils mit den Testkeimen (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538,

METHODEN

Escherichia coli ATCC 11303, ATCC 11775 und D31, *Bacillus megaterium* ATCC 14581) in einer Petrischale verteilt (Temperatur des Agars 46°C). Nachdem der Agar fest geworden war, wurden 5 µl der zu untersuchenden Proben in eine vorgestanzte Vertiefung (Durchmesser 2,5 mm) pipettiert. Die Petrischalen wurden anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der unterliegende Agar mit 10 ml überliegendem Agar (1% Agarose; 3,4% Caseinpepton; 0,6% Tryptic soy peptone; 0,5% Glucose; 1% NaCl; 0,5% K₂HPO₄) überschichtet (Temperatur des Agars 46°C). Die Agar-Platten wurden für weitere 3-4 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Hemmhöfe analysiert und vermessen. Humanes-Lysozym (500ng/Well) diente dabei als positive Kontrolle. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Infektionsmedizin (Prof. Podschun) durchgeführt.

3.4.8 Immunohistochemische Untersuchungen

Die für die immunhistochemischen Versuche eingesetzten Kryoschnitte wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Leib (Institut für Infektionserkrankungen, Universität Bern) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Gehirnschnitte von 11 Tage alten Ratten, die mit dem Gram-positiven Bakterium *Streptococcus pneumoniae* Typ 3 intrazisternal (*Cisterna magna*) infiziert wurden. Die Tiere wurden für 0, 12, 22 und 39 h infiziert. Die Kryoschnitte wurden zuerst für 5 Min. mit eiskaltem Aceton fixiert, um anschließend in PBS-Puffer mit 0,1 % Triton X für zehn Minuten inkubiert zu werden, wodurch die Permeabilität der Plasmamembran erhöht wurde. Nach drei Waschschritten in TRIS-Puffer wurden die unspezifischen Bindestellen mit 1,5% BSA in TRIS-Puffer blockiert und anschließend die Schnitte mit dem ersten primären Antikörper, der ebenfalls in 1,5% BSA-Lösung gelöst war, beladen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Es folgte wieder dreimaliges Waschen mit TRIS-Puffer, bevor die Schnitte mit dem ersten sekundären Antikörper inkubiert wurden, der ebenfalls wieder mit 1,5% BSA in TRIS-Puffer verdünnt wurde. Der Antikörper verblieb im Dunkeln für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten. Danach wurden die Objektträger wieder mit TRIS-Puffer gewaschen und der zweite primäre Antikörper hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte wieder bei 4°C über Nacht. Nach wiederholtem Waschen wurde der zweite sekundäre Antikörper für eine Stunde auf die Schnitte gegeben und diese im Dunkeln belassen. Erneut wurde dreimal mit TRIS-Puffer gewaschen, bevor die Kerne mit Bisbenzimid gegengefärbt wurden. Hierzu wurden die Schnitte für 15 Minuten mit Bisbenzimid-Lösung bedeckt und anschließend das überflüssige Bisbenzimid mit Aquadest abgewaschen. Das Eindeckeln erfolgte mit Immomount. Die Färbungen wurden mit Hilfe eines Zeiss Axiovert Mikroskop photographiert (Zeiss,

METHODEN

Göttingen, Deutschland).

3.5 ELISA

3.5.1 Allgemein

Um die Konzentration der AP im *Liquor cerebrospinalis* zu bestimmen, wurde ein Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Die Liquorproben wurden freundlicherweise durch Herrn Dr. med Henrik Wilms (Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel) zur Verfügung gestellt. Dabei werden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) wird an die Wände einer 96-well-Mikrotiterplatte gekoppelt. Im nächsten Schritt wird die Probe zusammen mit dem *coating*-Antikörper inkubiert. Anschließend wird ein zweiter Antikörper (*detection*-Antikörper) dazugegeben, an dessen Ende ein Enzym gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet an das Antigen und es entsteht dabei ein Antikörper-Antigen-Komplex (daher auch *Sandwich-ELISA*). Im Anschluss wird ein zum Enzym passenden Substrat dazugegeben. Die Enzym-Substrat-Reaktion wird durch einen Farbumschlag sichtbar gemacht und gemessen.

3.5.2 LL-37 ELISA

Für den ELISA wurden 96-Loch-Platten mit 100 µl pro Vertiefung Kaninchen-Anti-LL-37 (0,5 µg/ml) in 0,05 M Carbonatpuffer pH 9,6 bei 4°C über Nacht vorbeschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% Tween20 in PBS, wurden mit 1% BSA (Bovine-Serum-Albumin) in 1% Tween20 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurden die entsprechenden Liquorproben (100 µl) in die jeweiligen Löcher und humanes rekombinates LL-37 für die Verdünnungsreihe gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnungsreihe enthielt folgende aufsteigende Konzentrationen: 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 ng/ml LL-37. Danach wurden die Löcher erneut dreimal gewaschen und die Vertiefungen mit biotinyliertem Kaninchen-Anti-LL-37 (0,2 µg/ml) in 1% Tween20 in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3x) wurden die Löcher mit jeweils 100 µl Streptavidin-Peroxidase 1:10.000 in 0,1% Tween20 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Löcher wurden anschließend gründlich gewaschen (6x) und jeweils 100µl TMB (3,3',5'-Tetramethylbenzidin) dazugegeben und für 10-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Sobald ein ausreichender Farbumschlag zu verzeichnen war, wurde die Reaktion

METHODEN

mit 100 µl pro Vertiefung 1N H₂SO₄ gestoppt. Abschließend wurde die Absorption bei 450 nm mittels eines Multikanal-Photometers (Sunrise; Tecan, Carlsheim, Deutschland) gemessen und ausgewertet.

3.5.3 HBD-2 und 3 ELISA

Für den HBD-2 und 3 ELISA wurden 96-Loch-Platten mit 100 µl pro Vertiefung Ziege-Anti-HBD-2 Antikörper (0,5 µg/ml) oder Kaninchen Anti-HBD-3 (1 µg/ml) in 0,05 M Carbonatpuffer pH 9,6 bei 4°C über Nacht vorbeschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% Tween20 in PBS, wurden mit 1% BSA (Bovine-Serum-Albumin) in 1% Tween20 in PBS für 10 min bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurden die entsprechenden Liquorproben (100 µl) in die jeweiligen Löcher und humanes rekombinates HBD-2 oder 3 für die Verdünnungsreihe gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnungsreihe enthielt folgende aufsteigende Konzentrationen für HBD-2: 0; 0.78; 1.56; 3.13; 6.25; 12.5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 ng/ml HBD-2 und für HBD-3: 0; 0.023; 0.047; 0.094; 0.188; 0.375; 0.75; 1.5 µg/ml HBD-3. Danach wurden die Löcher erneut dreimal gewaschen und die Vertiefungen mit biotinyliertem Ziege-Anti-HBD-2 (0,2 µg/ml) oder Kaninchen Anti-HBD-3 (0,5 µg/ml) in 1% Tween20 in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3x) wurden die Löcher mit jeweils 100 µl Streptavidin-Peroxidase 1:10.000 in 0,1% Tween20 in PBS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Löcher wurden anschließend gründlich gewaschen (6x) und jeweils 100µl 2.2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure (ABTS; Roche Diagnostics) dazugegeben und für 15-45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Sobald ein ausreichender Farbumschlag zu verzeichnen war, wurde die Reaktion mit 100 µl pro Vertiefung 1N H₂SO₄ gestoppt. Abschließend wurde die Absorption bei 405 nm mittels eines Multikanal-Photometers (Sunrise; Tecan, Carlsheim, Deutschland) gemessen und ausgewertet.

3.5.4 Lysozym ELISA

Die Menge an Lysozym in den Liquorproben wurde anhand eines kommerziell verfügbaren ELISA-Kits (Immundiagnostik, Bensheim, Germany) bestimmt. Der ELISA wurde entsprechend des beigefügten Protokolls durchgeführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) mittels eines Multikanal-Photometers (Sunrise; Tecan, Carlsheim, Deutschland) bestimmt.

3.5.5 Bestimmung der NO-Produktion

Die Astrozyten- und Mikroglia-Zellkulturen wurden mit Bakterienüberständen für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Entstehung von Stickstoffmonoxid (NO) mithilfe der Messung der Nitrit-Akkumulation im Medium bestimmt. Dazu wurden die Zellkulturüberstände mit Griess-Reagenz (1% Sulphanilamid und 0,1% N-(Naphthyl)-Ethyldiamin-Dihydrochlorid in 5% H₃PO₄; *Sigma, Deutschland*) gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption mittels eines Multikanal-Photometers (Sunrise; Tecan, Carlsheim, Deutschland) bei 540 nm gemessen. Natrium-Nitrit (NaNO₂; Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde für die Erstellung der Standardkurve verwendet.

3.6 Datenanalysen

Alle Experimente wurden wenigstens in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Signifikanz der Differenz zwischen Test- und Kontrollgruppe wurde durch ANOVA (Analyse der Varianz) gefolgt von der Bonferroni-Methode ermittelt. Die Daten wurden mittels des Programms GraphPad Prism 3.0 graphisch dargestellt.

IV ERGEBNISSE

4.1 Nachweis des humanen antimikrobiellen Peptides LL-37 im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten mit bakterieller Meningitis

Zuerst wurde das Vorkommen von AP im *Liquor cerebrospinalis* (LCS) anhand der Detektion des humanen Cathelizidins LL-37 in Proben von Patienten mit bakterieller Meningitis und nichtinfizierten Kontrollpersonen mittels Sandwich-ELISA analysiert. Dabei wurden der Liquor sowie auch das Serum von Patienten mit bakterieller Meningitis unter Einwilligung für die Weiterverwendung diagnostischer Zwecke entnommen. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg der LL-37-Konzentration (bis hin zu 84,1 +/- 19,8 ng/ml) im LCS von den infizierten Patienten, während das Serum und der LCS von den gesunden Kontrollen keinen Anstieg von LL-37 zeigte (Abb. 1A). Zusätzlich wurde ein signifikanter Anstieg der LL-37-Konzentration (30.6 +/- 7.8 ng/ml) in den Proben von Patienten mit einer *Herpes-simplex-Enzephalitis* detektiert, im Gegensatz zu den Liquor- und Serumproben von Patienten mit *Cytomegalievirus-Meningitis*.

Weiterhin wurde das Vorhandensein der Humanen- β -Defensine-2 und -3 im *Liquor cerebrospinalis* und Serum der Meningitis-Patienten und nicht-infektiösen Kontrollen mittels ELISA untersucht. Es zeigte sich keine Erhöhung der Konzentration in den Liquor- und Serumproben der erkrankten Patienten im Vergleich zu den nicht-infektiösen Kontrollen (Abb. 1B und C). Allerdings konnte mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) für das Humane- β -Defensin-2 ein Anstieg in den Meningitis-Proben festgestellt werden (Kontrolle 1.8 ng/ml; Meningitis-Proben 13.1 ng/ml). Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Prof. Schröder (Hautklinik, Kiel) zur Verfügung gestellt.

ERGEBNISSE

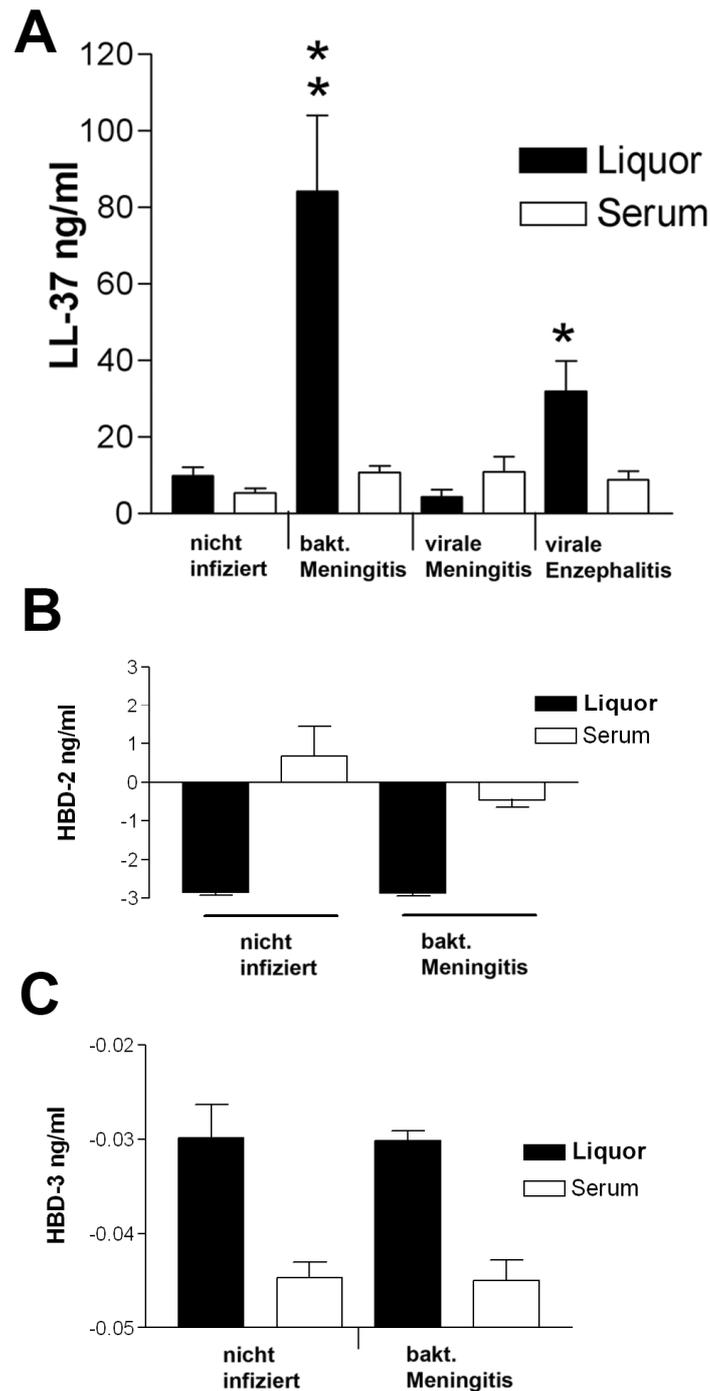


Abb. 1: Nachweis von LL-37 im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten mit bakterieller Meningitis. *Liquor cerebrospinalis* („Liquor“) und Serum-Proben von Patienten mit bakterieller Meningitis sowie Virusinfektionen des ZNS und nicht-infizierten Kontrollen wurden mittels ELISA hinsichtlich dem Vorhandensein von LL-37 (A), humanen beta-Defensin-2 (B) und 3 (C) untersucht. Es wurden Proben von bis zu acht verschiedenen Patienten getestet. Signifikanz: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$.

4.2 Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten mit bakterieller Meningitis

Im nächsten Schritt wurde die antimikrobielle Aktivität des *Liquor cerebrospinalis* und des Blutserums der Meningitispatienten untersucht. Dabei wurde der Platten-Diffusionstest als mikrobiologisches Testverfahren angewandt. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe der Abteilung von Prof. R. Podschun im Institut für Infektionsmedizin (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel). Die verwendeten Test-Bakterienstämme wurden aufgrund ihrer Sensibilität gegenüber AP ausgewählt. Dabei zeigten die Ergebnisse in Abbildung 2, dass der *Liquor cerebrospinalis* gesunder Kontroll-Probanden keine antimikrobielle Aktivität aufweist. Die Liquor-Proben der Meningitispatienten zeigten jedoch eine deutliche Zunahme der antimikrobiellen Aktivität gegen verschiedene Testkeime. Für die antimikrobielle Aktivität gegenüber *Escherichia coli* (ATCC 11303) und *Bacillus megaterium* konnte eine signifikante Zunahme im Vergleich zu den Kontrollproben festgestellt werden. Für die Serumproben konnte sowohl für infizierte Patienten als auch nicht-infizierte Proben eine antimikrobielle Aktivität gegenüber dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* (Stränge ATCC 11303, 11775, und D31) und gegenüber dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus megaterium* beobachtet werden. Allerdings bestand hier kein Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Um eine Beteiligung anderer Bestandteile der angeborenen Immunantwort an der antimikrobiellen Aktivität des *Liquor cerebrospinalis* zu untersuchen, wurden die Proben mit N,N,N-Triacetyl-Chitotriose preinkubiert; mit welchem die Aktivität von Lysozym inhibiert werden kann. Die dadurch erreichte Hemmung des Lysozym führte zu keinem Unterschied der antimikrobiellen Aktivität des *Liquor cerebrospinalis*. Zusätzlich wurde die Lysozymkonzentration im LCS mittels Sandwich-ELISA untersucht, um eine eventuelle neutrophile Aktivität nachzuweisen. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Lysozymquantität in den Liquor-Proben im Vergleich zu den Serumproben, allerdings aber keinen Unterschied in der Lysozymkonzentration der Liquor- und Serumproben zwischen Meningitispatienten und gesunden Kontrollen (Fig. 3).

Weiterhin wurden die Proben für 30 Minuten bei 56°C erhitzt, um die Aktivität des Komplementsystems zu inaktivieren. Die Resultate zeigten, dass die Hitzeinaktivierung keinen signifikanten Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der Liquor- und Serumproben der Meningitispatienten hatte (Abb. 2).

ERGEBNISSE

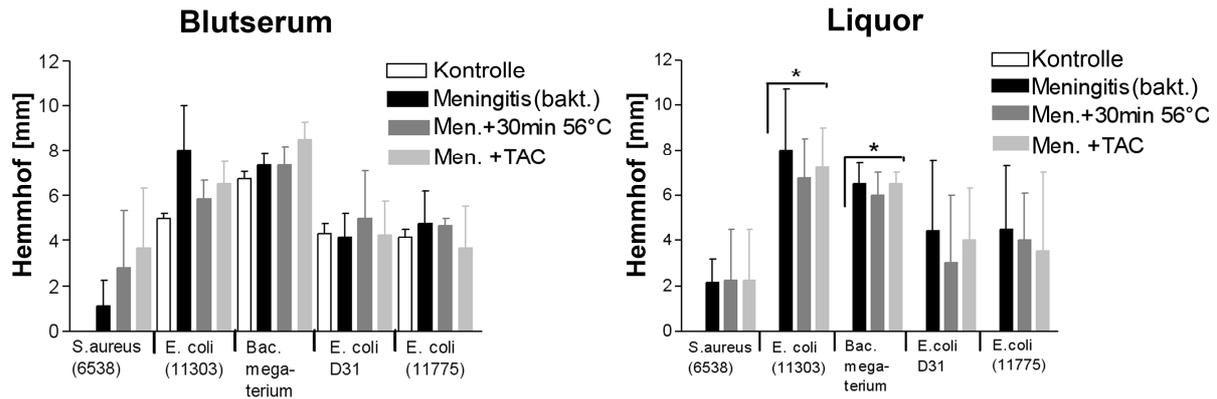


Abb. 2: Erhöhte antimikrobielle Aktivität im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten mit bakterieller Meningitis. Serum-Proben (A) und *Liquor cerebrospinalis* („Liquor“; B) von Patienten mit bakterieller Meningitis und nicht-infizierten Kontrollen wurden hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität mittels Plattendiffusion-Test gegen verschiedene Gram-positive und Gram-negative Testkeime untersucht. Zur Hemmung der Lysozym-Aktivität wurden die Proben mit 10 μ M N, N, N-triacetylchitotriose (+TAC) präinkubiert (30 min). Zur Inaktivierung der Komplement-Aktivität wurden die Proben für 30 min bei 56°C erwärmt (+30min 56°C). Es wurden Proben von bis zu acht verschiedenen Patienten getestet. Signifikanz: *: $p < 0,05$.

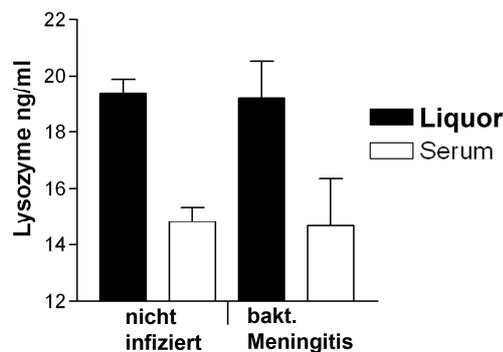


Abb. 3: Keine erhöhte Lysozym-Konzentration im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten mit bakterieller Meningitis. *Liquor cerebrospinalis* („Liquor“) und Serum-Proben von Patienten mit bakterieller Meningitis und nicht-infizierten Kontrollen wurden mittels ELISA hinsichtlich des Vorhandenseins von Lysozym untersucht. Es wurden Proben von bis zu acht verschiedenen Patienten getestet.

4.3 Zunahme der rCRAMP-Expression in primären Astrozyten und Mikroglia-Kulturen aus der Ratte nach Behandlung mit Bakterienüberständen

Im nächsten Schritt wurde eine mögliche Beteiligung der verschiedenen Zellpopulationen des Gehirns an der AP-Produktion untersucht. Dazu wurde anhand von primären Gliazellkulturen

ERGEBNISSE

aus neugeborenen Ratte (Astrozyten und Mikrogliazellen) die Expression des homologen Rattengens für das humane LL-37, das Cathelizidin rCRAMP, mittels *real time* RT-PCR und Western Blot untersucht. Dabei wurde die zeitabhängige mRNA-Expression und die Protein-Expression des rCRAMP in primären Gliazellen aus der Ratte nach der Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Überständen analysiert. Für die Behandlungen wurden die bakteriellen Überstände der Gram-positiven Bakterien *Streptococcus pneumoniae* (SP) und *Staphylococcus aureus* (SA) sowie Gram-negativen Bakterien *Neisseria meningitidis* (NM) und *Pseudomonas aeruginosa* (PA) verwendet. Die Ergebnisse zeigen, daß die maximale rCRAMP-mRNA-Expression in Astrozyten 6h nach der Inkubation mit PA zu beobachten ist (PA 58 \pm 12 fache Zunahme) (Abb. 4A). Bei der Stimulation mit SA, NM und SP wurde der größte Anstieg der rCRAMP – Expression 24h nach der Behandlung festgestellt. (NM, 12.2 \pm 1.6 fache; SP, 10.8 \pm 2.3 fache; SA, 3.3 \pm 0,8 fache Zunahme, Abb. 4A). Für die Mikrogliazellen (Abb. 4B) konnte die maximale rCRAMP-Expression 6h nach der Behandlung mit SP, NM, SA, und PA beobachtet werden (16.5 \pm 3 fache; 10.4 \pm 3 fache; 13 \pm 3.5 fache; 7.5 \pm 2 fache Zunahme).

Weiterhin wurde die Expression von rCRAMP auf der Proteinebene mittels Western Blot untersucht (Abb. 4C - F). Die Ergebnisse wurden densitometrisch quantifiziert. Für die Astrozyten (Abb. 4C und E) wurde die maximale rCRAMP-Proteinexpression 6h nach der Stimulation mit SA (497 \pm 86%), 12h nach der Stimulation mit NM (894 \pm 203 %) und 24h nach der Stimulation mit PA (803 \pm 53%) und SP (904 \pm 37%) im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Für die Mikrogliazellen (Abb. 4D und F) konnte die maximale rCRAMP-Proteinexpression 6h nach der Stimulation mit PA und SA (212 \pm 8.5%; und 188 \pm 7.5%) und 12h nach der Stimulation mit NM und SP bestimmt werden (168 \pm 12%; und 165 \pm 15.5%).

ERGEBNISSE

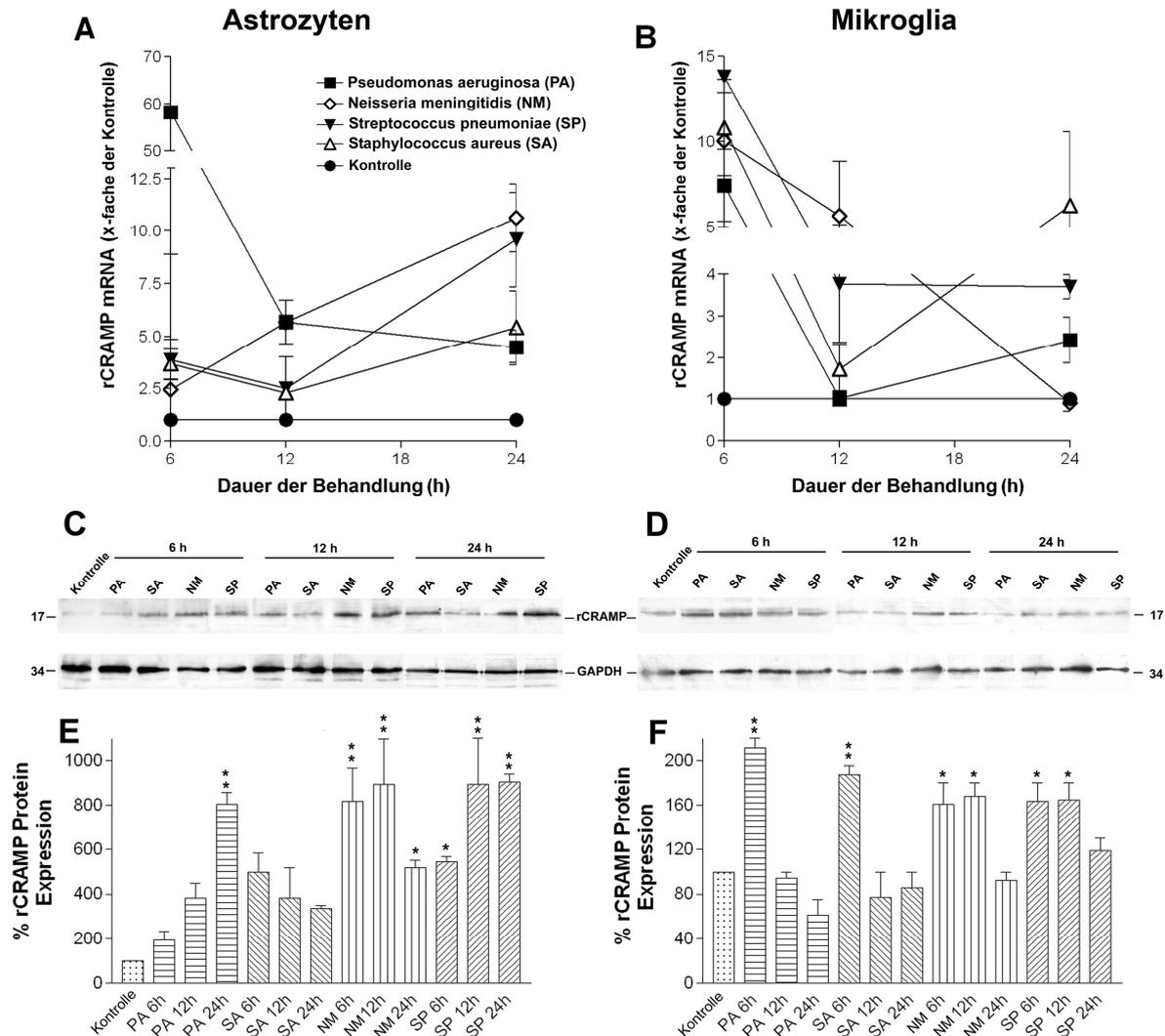


Abb. 4: Induktion der rCRAMP-mRNA- und -Proteinexpression in Rattengliazellen nach der Stimulation mit Bakterienüberständen. Nach der Behandlung der Astrozyten (A) und Mikrogliazellen (B) mit Bakterienüberständen von SP, SA, NM und PA für 0, 6, 12 und 24 h wurde die mRNA-Expression mittels SYBR Green *real-time* RT-PCR im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen bestimmt. GAPDH diente dabei als endogene Kontrolle. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert von fünf unabhängigen Versuchen in dreifacher Ausführung. Die rCRAMP-Proteinexpression in Astrozyten (C) und Mikroglia (D) wurde mittels Western Blot untersucht. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden mithilfe der densitometrischen Quantifizierung sowohl für Astrozyten (E) als auch für Mikrogliazellen (F) bestimmt. Die Sterne und Doppel-Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$), berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.4 Antimikrobielle Aktivität der Zellkulturüberstände von primären Gliazellen aus der Ratte nach der Stimulation mit den Bakterienüberständen

Nachdem die vorherigen Versuche die Expression von rCRAMP in den Gliazellen auf der RNA- als auch Proteinebene nachweisen konnten, wurde im nächsten Schritt eine mögliche antimikrobielle Aktivität der Zellkulturüberstände der behandelten Gliazellen mittels des Platten-Diffusionstest untersucht. Die Analyse der antimikrobiellen Eigenschaften der Gliazellüberstände zeigte, dass Astrozyten eine antimikrobielle Aktivität gegenüber dem Gram-positiven Bakterium und antimikrobiellen Testkeim *Bacillus megaterium* besitzen (Abb. 5). Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg der antimikrobiellen Aktivität für die Überstände von Astrozyten, die zuvor für 24h mit Bakterienüberständen der Gram-negativen Keime PA und NM behandelt wurden (im Vergleich zur Kontrolle). Die Behandlung mit den Gram-positiven Bakterienüberständen von SA und SP führte zu keinem signifikanten Anstieg der antimikrobiellen Aktivität.

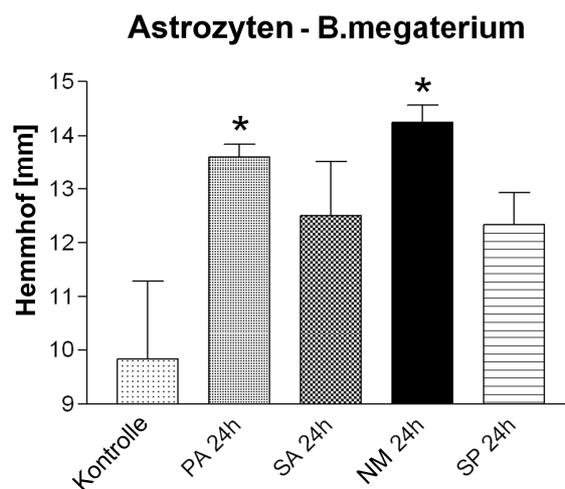


Abb. 5: Antimikrobielle Aktivität der Zellkulturüberstände von primären Astrozyten aus der Ratte nach der Stimulation mit den Bakterienüberständen. Nach der Behandlung der Astrozyten mit Bakterienüberständen von SP, SA, NM und PA für 24 h wurden die Zellkulturüberstände mittels Platten-Diffusionstest auf eine antimikrobielle Aktivität gegenüber dem Gram-positiven Testkeim *Bacillus megaterium* untersucht. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert von vier unabhängigen Versuchen. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (*, $p < 0,05$), berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

Weiterhin wurden die Zellkulturüberstände von primären Mikroglia-Kulturen aus der Ratte hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität im Platten-Diffusionstest untersucht. Nach 24h der

ERGEBNISSE

Behandlung mit NM konnte eine signifikante antimikrobielle Aktivität gegenüber den Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) und *Bacillus megaterium* sowie gegenüber den Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* (ATCC11303; Abb. 6) bestimmt werden. Die Behandlung der Mikrogliazellen mit SP, SA und PA führte zu keinem signifikanten Anstieg der antimikrobiellen Aktivität gegenüber dem Kontrollmedium.

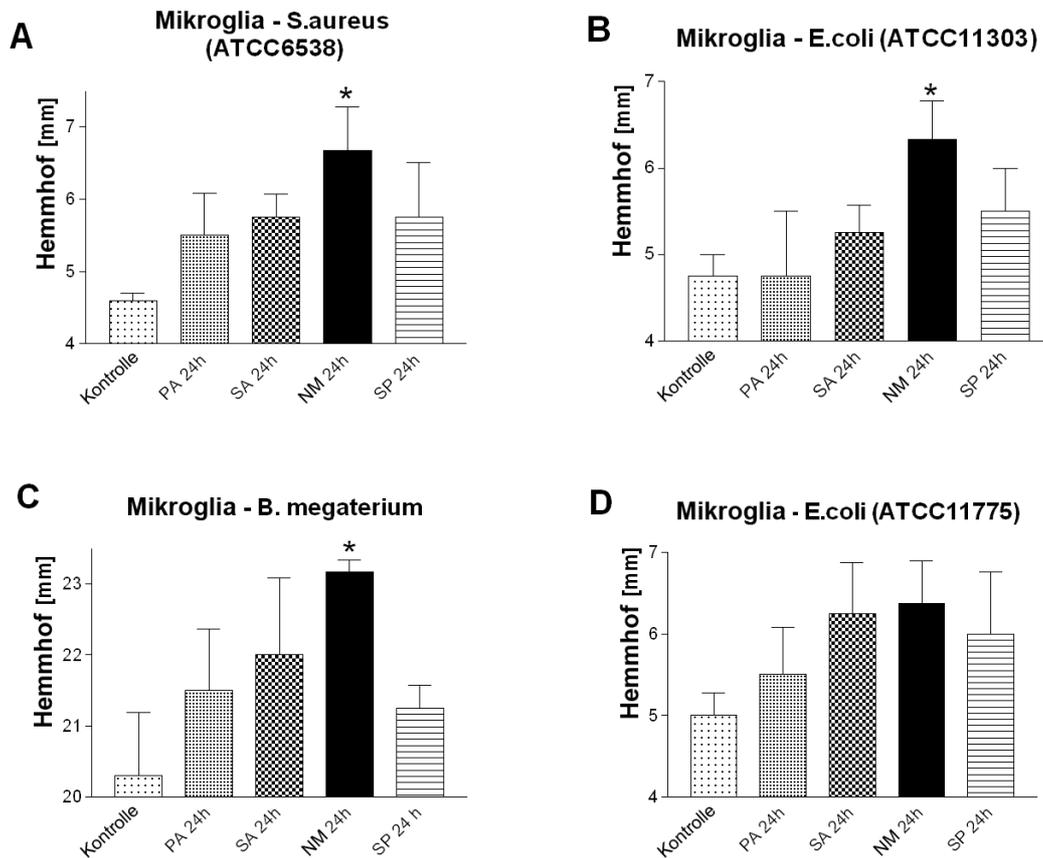


Abb. 6: Antimikrobielle Aktivität der Zellkulturüberstände von primären Mikrogliazellen aus der Ratte nach der Stimulation mit den Bakterienüberständen. Nach der Behandlung der Astrozyten mit Bakterienüberständen von SP, SA, NM und PA für 24 h wurden die Zellkulturüberstände mittels Platten-Diffusionstest auf eine antimikrobielle Aktivität gegenüber dem *S. aureus* (A), *B. megaterium* (C) und *E. coli* (B - ATCC 11303; D - ATCC 11775) untersucht. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert von vier unabhängigen Versuchen. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (*, $p < 0,05$), berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.5 Nachweis der rCRAMP-Immunoreaktivität in einem Rattenmodell für die Pneumokokkenmeningitis

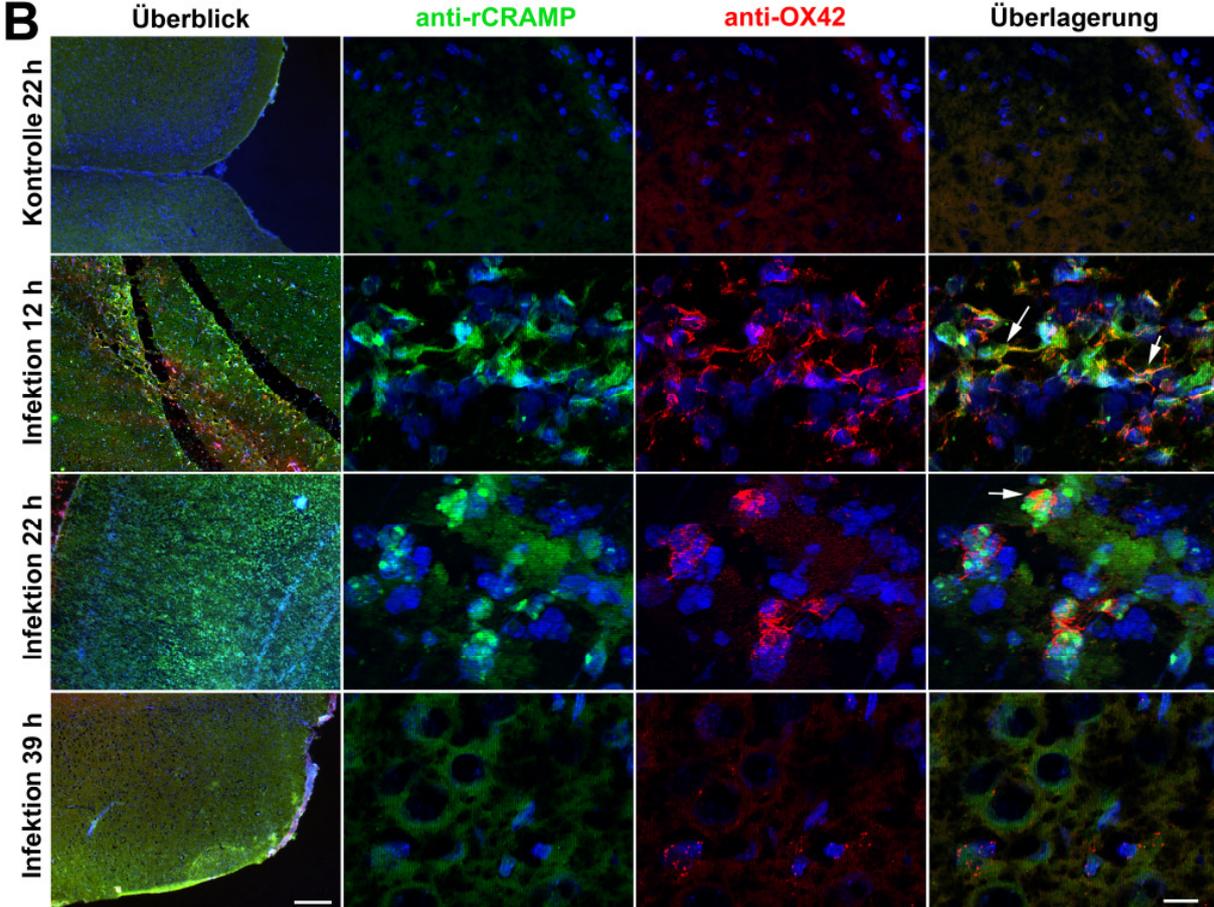
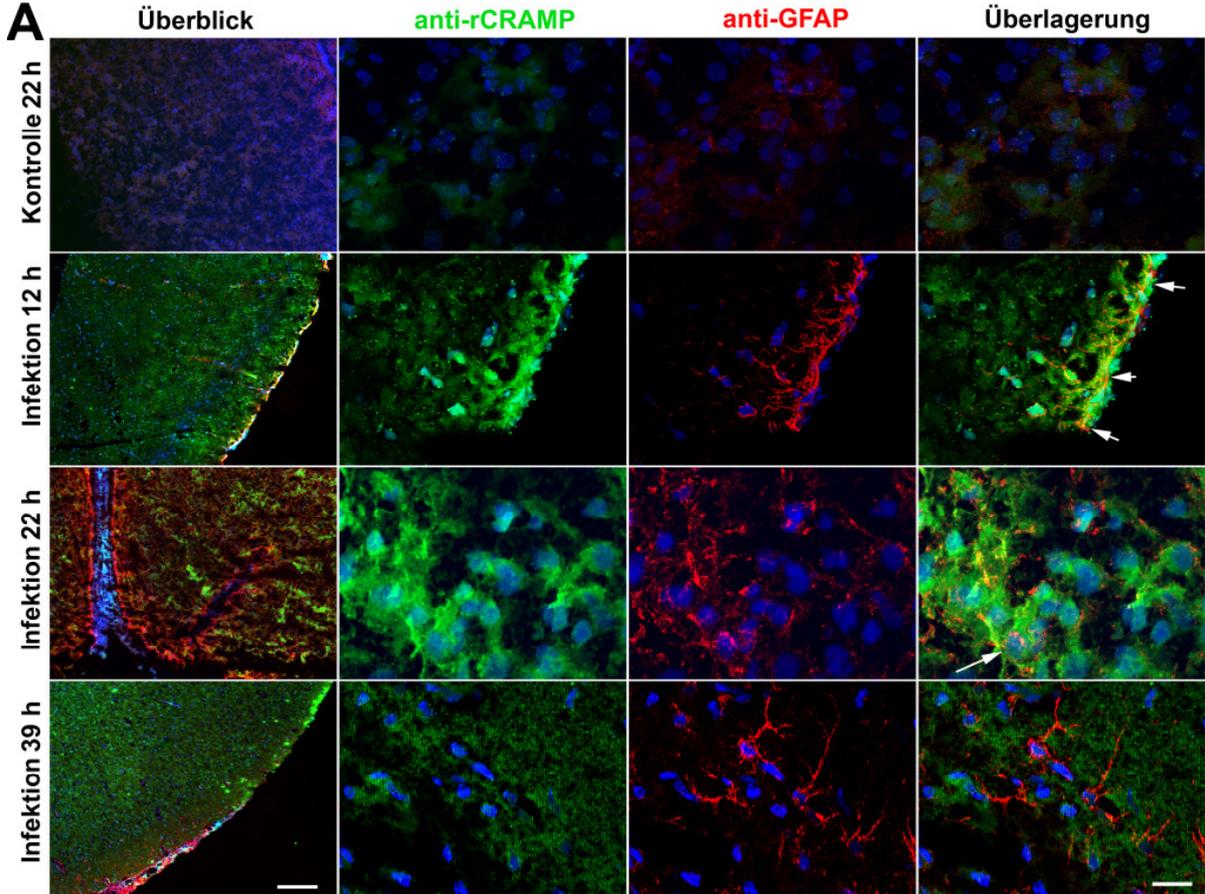
Weiterhin wurde die rCRAMP-Immunoreaktivität und Lokalisation in Bezug auf die

ERGEBNISSE

Gliazellen mit Hilfe von Hirnschnitten der Ratte, die mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert wurden, untersucht. Die Hirnschnitte wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Leib (Universität Bern) zur Verfügung gestellt. Die jungen Ratten (Tag 11) wurden mit dem Meningitiserreger infiziert und jeweils nach 0, 12, 22 und 39h getötet. Die Immunoreaktivität für rCRAMP und Markern für die Gliazellen (*Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) für aktivierte Astrozyten und CD11b/c (OX42) für Mikroglia-/ Makrophagen) wurde mittels Immunofluoreszenz detektiert. Die nicht-infizierten Kontrollschnitte zeigten nur eine sehr schwache GFAP-Färbung (Abb. 7A). 12 h nach der Infektion konnte jedoch eine sehr starke GFAP-Färbung in der *Membrana glia limitans* beobachtet werden (Abb. 7B). Auch 22h nach der Infektion zeigte sich subkortikal eine erhöhte GFAP-Färbung (Abb. 7C). Gleichzeitig konnte nach 12 und 22 h nach der Infektion eine deutliche rCRAMP-Immunoreaktivität kolokalisiert zu den GFAP-positiven Zellen beobachtet werden. 39h nach der Infektion wurde eine reduzierte Immunoreaktivität für rCRAMP festgestellt, während die GFAP-Färbung eine unveränderte Intensität aufwies.

In Bezug auf den Mikroglia-/Makrophagenmarker OX-42 zeigten die Kontrollschnitte ebenfalls eine sehr schwache Färbung (Abb. 7B). 12h und 22h nach der Infektion war die Zahl der OX42-positiven Zellen deutlich in subkortikalen Bereichen erhöht, während nach 39h das Kontrollniveau fast wieder erreicht wurde. Für die rCRAMP-Immunoreaktivität konnte eine Kolokalisation nach 12 und 22 h beobachtet werden. Weiterhin zeigten die Ependymzellen (Abb. 8) des *Liquor cerebrospinalis*-bildenden *Plexus choroideus*, genauso wie die Zellen der *Membrana glia limitans* (Abb. 7A) eine positive rCRAMP Färbung 12, 22 und 39h nach Infektion.

ERGEBNISSE



ERGEBNISSE

Abb. 7: Proteinexpression von rCRAMP im Ratten-Tiermodell für die Pneumokokkenmeningitis. Nach der Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* wurden koronale Hirnschnitte entnommen, fixiert und anschließend mittels Antikörpern (anti-rCRAMP (grün); Astrozytenmarker anti-GFAP (rot); Mikroglia-/Makrophagenmarker anti-OX42 (rot)) gefärbt, um das Vorhandensein des rCRAMP in Astrozyten (A) und Mikrogliazellen (B) mittels der Doppel-Floureszenz-Mikroskopie nachweisen zu können. Die Kernfärbung erfolgte mit Bisbenzimid. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Maßstab: 200 μm – Überblick; 20 μm – Ausschnitt.

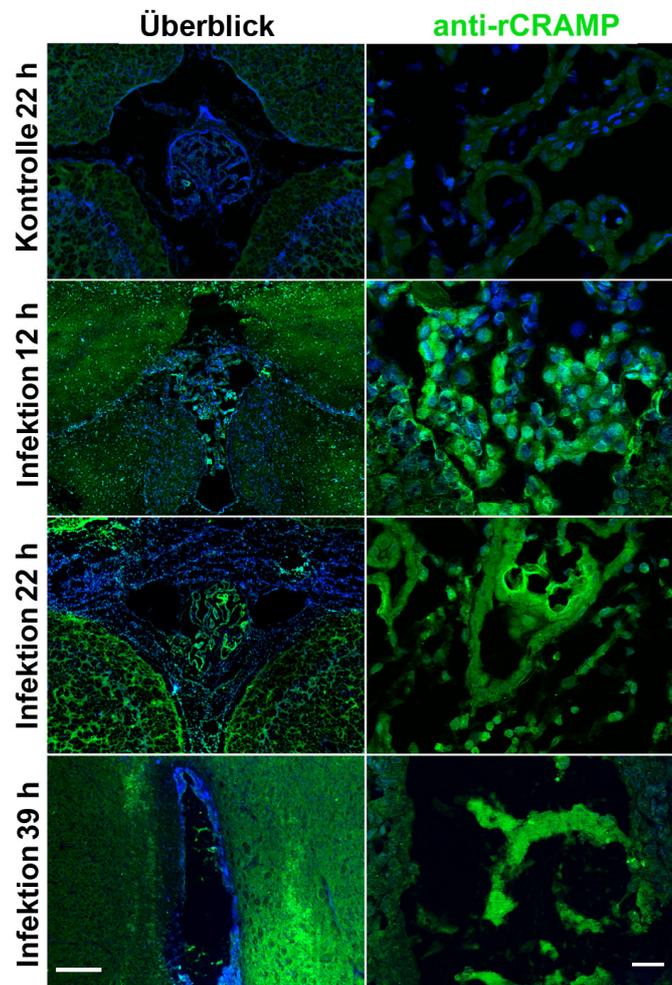


Abb. 8: Nachweis der rCRAMP-Immunoreaktivität im Plexus choroideus und in Ependymzellen. Nach der Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* wurden koronale Hirnschnitte entnommen, fixiert und anschließend mittels Antikörpern (anti-rCRAMP (grün)) gefärbt und mittels der Doppel-Floureszenz-Mikroskopie nachgewiesen. Die Kernfärbung erfolgte mit Bisbenzimid. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Maßstab: 200 μm – Überblick; 20 μm – Ausschnitt.

4.6 Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege durch die Bakterienüberstände in primären Gliazellen aus der Ratte

Mit den folgenden Untersuchungen wurde die mögliche Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege an der rCRAMP-Expression in den Gliazellen untersucht. Zuerst wurde dazu die Aktivierung der Signaltransduktionswege durch die Bakterienüberstände analysiert. Dazu wurden primäre Astrozyten und Mikrogliazellen mit Bakterienüberständen inkubiert und anschließend die Konzentration von Nitrit-(NO) sowie die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase ERK1/2 bestimmt. Der MAP-Kinase-Signalweg ist unter anderem an die Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt, während NO ein wichtiges proinflammatorisches Signalmolekül darstellt („*second messenger*“). Wie in der Abb. 9A und B gezeigt, führte die Behandlung der Astrozyten als auch der Mikrogliazellen mit allen Bakterienüberständen zu einer deutlich erhöhten ERK1/2-Phosphorylierung. Für die Bestimmung der Nitrit- (NO) -Produktion wurde Lipopolysaccharid (LPS; 100ng/ml) von *Salmonella typhimorium* als Positivkontrolle verwendet. Die Behandlung mit LPS führte zu einem signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration in den Zellkulturüberständen 24h nach der Stimulation im Vergleich zu den nicht-behandelten Kontrollen (3.3 +/- 0.1 μ M für Astrozyten und 15.5 +/- 0.5 μ M für Mikrogliazellen; Abb. 9C und D). In Astrozyten konnte durch die 24-stündige Behandlung mit NM und PA eine signifikante Zunahme der NO-Konzentration im Überstand induziert werden, während interessanterweise die Behandlung mit den Bakterienüberständen der Gram-positiven Bakterien SP und SA keine Zunahme beobachtet werden konnte (Abb. 9C). In Mikrogliazellen führte die Behandlung mit NM, PA und SP zu einem signifikanten Anstieg der Nitrit-(NO)-Konzentration, während in diesen Zellen nur SA keinen Anstieg der NO-Menge auslösen konnte (Abb. 9D).

4.7 Untersuchungen zur Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege an der rCAMP-Expression in primären Gliazellen aus der Ratte

Um die Beteiligung der verschiedenen Signaltransduktionswege an der rCRAMP-Expression zu analysieren, wurde die rCRAMP mRNA Expression nach der Behandlung der Gliazellen mit den Bakterienüberständen und spezifischen Inhibitoren für die verschiedenen Signaltransduktionswege mittels *realtime* RT-PCR bestimmt. Hierfür wurden Inhibitoren für den NO-Signalweg, die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 und den wichtigen proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B verwendet. PD98059 (MEK1 Inhibitor) ist ein hoch selektiver Inhibitor der MAP-Kinase, SB203580 ist ein spezifischer Inhibitor der

ERGEBNISSE

p38 MAP-Kinase und CAPE (Koffeinsäure-Phenylethylester) hemmt spezifisch die Translokation des Transkriptionsfaktor NF κ B zur DNS. Die Inhibition der iNOS (induzierbare NO-Synthase) mit L-NMMA, wodurch die NO-Produktion vermindert wird, hatte keinen Effekt auf die rCRAMP-Expression in Astrozyten (Abb. 9E). In Mikroglia konnte eine signifikante Abnahme der rCRAMP-Expression detektiert werden, nachdem iNOS mittels L-NMMA inhibiert wurde (Abb. 9F). Hingegen führte eine Präinkubation mit den Hemmstoffen der Signalwege für die MAP-Kinasen als auch eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu einer signifikanten Reduktion der durch die verschiedenen Bakterienüberstände induzierten rCRAMP-Expression in Astrozyten als auch Mikrogliazellen (Abb. 9E und F).

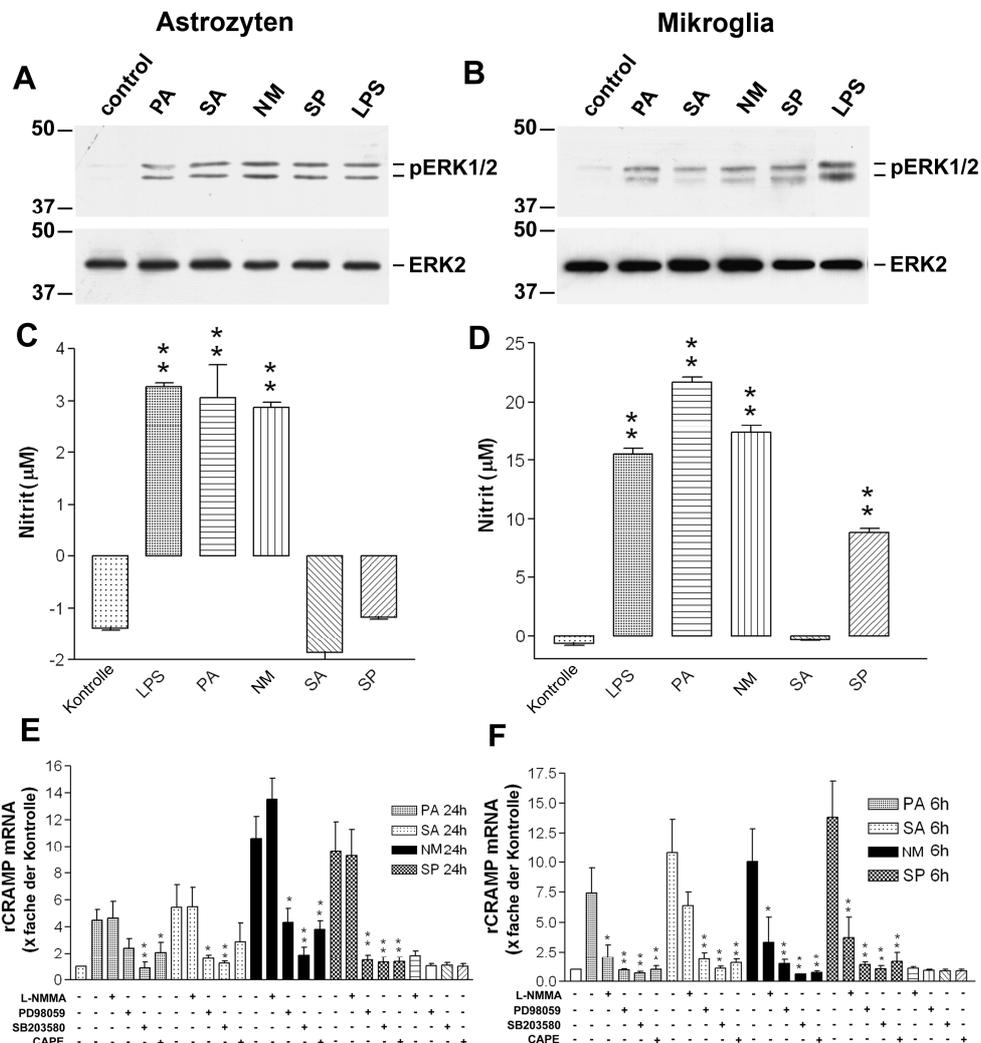


Abb. 9: Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege an der rCRAMP-Expression in primären Gliazellen. Astrozyten (A) und Mikrogliazellen (B) wurden mit bakteriellen Überständen von SP, SA, NM und PA für 5 min bei 37°C behandelt, und die ERK 1/2 – Phosphorylierung mittels Western Blot bestimmt. Zwei weitere Versuche zeigten ähnliche Befunde. Astrozyten

ERGEBNISSE

(C) und Mikrogliazellen (D) wurden für 24 h bei 37°C mit den Bakterienüberständen behandelt und anschließend die Nitrit-(NO)-Konzentration bestimmt. Als Positivkontrolle für die Zunahme der NO-Produktion wurde Lipopolysaccharid (LPS; 100 ng/ml) von *Salmonella typhimorium* verwendet. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte (+/- Standardabweichung) von vier unabhängigen Versuchen in doppelter Ausführung. Doppel-Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (**, $p < 0,001$). Astrozyten (E) und Mikrogliazellen (F) wurden mit oder ohne Inhibitoren für die verschiedenen Signaltransduktionswege (100 μM L-NMMA, 1 μM CAPE, 10 μM PD98059 und SB203580) und den Bakterienüberständen von SP, SA, NM und PA für 24 h (E) oder 6 h (F) inkubiert und die mRNA-Expression mittels der SYBR green *realtime* RT-PCR im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen bestimmt. GAPDH diente dabei als endogene Kontrolle. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert von vier unabhängigen Versuchen in dreifacher Ausführung. Die Sterne und Doppel-Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$), berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.8 Induktion der rCRAMP-Expression durch die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und den Tumornekrosefaktor- α (TNF α) in primären Gliazellen

Im nächsten Schritt wurde eine mögliche Induktion der rCRAMP-Expression durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α in den Gliazellen mittels *realtime* RT-PCR untersucht. Die Stimulation mit den beiden proinflammatorischen Zytokinen führte zu einer Induktion von rCRAMP mRNA in Gliazellen. In Astrozyten konnte das Maximum der rCRAMP-Expression 12h nach der Stimulation mit IL-1 β (14.5 +/- 2 fache Zunahme) und 24h nach der Stimulation mit TNF α (21 +/- 6 fache Zunahme) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Abb. 10A). In Mikroglia konnte das Maximum in der rCRAMP-Expression 6h nach der Stimulation sowohl mit IL-1 β (6.2 +/- 1-fache Zunahme) als auch mit TNF α (6. +/- 2 fache Zunahme) beobachtet werden (Abb. 10B).

4.9 Induktion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und des Tumornekrosefaktor- α (TNF α) durch die verschiedenen Bakterienüberstände in primären Gliazellen

Im nächsten Schritt wurde die relative zeitabhängige mRNA-Expression von IL-1 β und TNF α nach der Behandlung der Gliazellen mit den Bakterienüberständen mittels *realtime* RT-PCR

ERGEBNISSE

untersucht. In Astrozyten wurde der maximale Anstieg der IL-1 β -Expression 24h nach der Stimulation mit PA im Vergleich zur Kontrolle detektiert (PA; 1002 +/- 134 fache Zunahme), (Abb. 10C). Die Behandlung mit SA, NM und SP führte zu einer maximalen Expression nach einer 24-stündigen Behandlung mit SA beziehungsweise 6-stündigen mit NM und SP (SA 280 +/- 127-fache; NM 75 +/- 3.5-fache; SP 42 +/- 12-fache Zunahme der Expression). Für TNF α wurde ein Maximum der Expression 6h nach der Stimulation mit PA, NM und SP (jeweils PA 214 +/- 30-fache; NM 27 +/- 10-fache; SP 11 +/- 3.5-fache Zunahme) und 24h nach der Stimulation mit SA (73 +/- 45-fache Zunahme) festgestellt (Abb. 10E). Die maximale Expression des IL-1 β in Mikrogliazellen wurde 12h nach der Stimulation mit PA (629 +/- 100 fache) und NM (280 +/- 89-fache Zunahme) beobachtet. SA und SP führten 6h nach der Stimulation zu einem maximalen Anstieg der IL-1 β -Expression (26 +/- 8-fache beziehungsweise 25 +/- 7-fache Zunahme; Abb. 10D). Wie in der Abb. 10F gezeigt, wurde ein maximaler Anstieg der TNF α -Expression 6h nach der Stimulation mit PA, NM, SA und SP im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (PA 97 +/- 38-fache; SA 97 +/- 56-fache; NM 81 +/- 22-fache; SP 7 +/- 2-fache Zunahme der Expression).

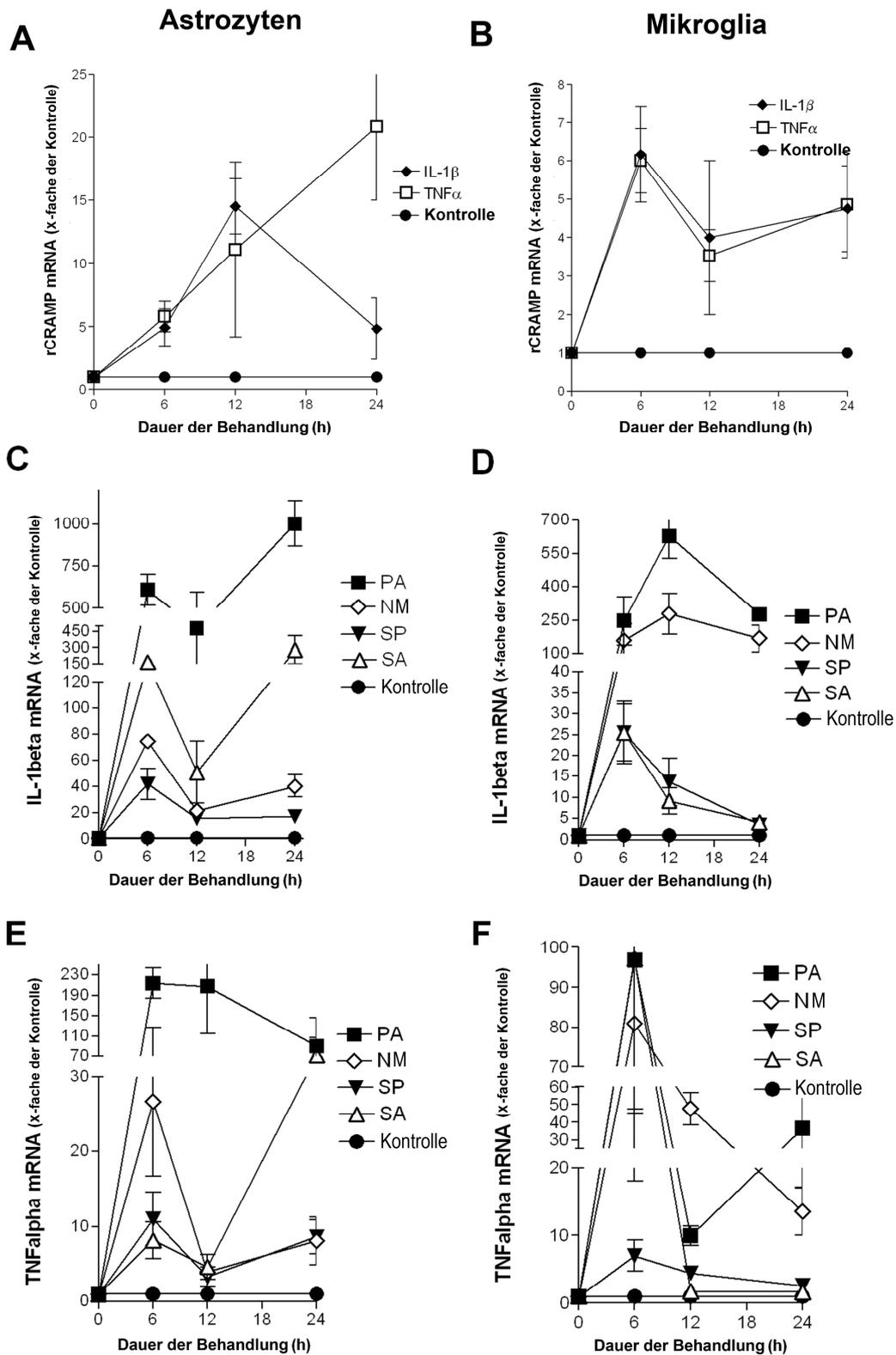


Abb. 10: Induktion der rCRAMP-Expression durch proinflammatorische Zytokine IL-1 β und TNF α in primären Gliazellen und Zunahme der Zytokine nach der Behandlung der Gliazellen mit verschiedenen Bakterienüberständen. Nach der Inkubation der Astrozyten (A) und und Mikrogliazellen (B) mit IL-1 β und TNF α (jeweils 10 ng/ml) in serumfreiem Medium für 0, 6, 12 und 24 h wurde die rCRAMP-mRNA-Expression mittels SYBR green *realtime* RT-PCR im Vergleich zur Kontrolle bestimmt. Dabei diente GAPDH als endogene Kontrolle. Die Ergebnisse

ERGEBNISSE

repräsentieren vier unabhängige Versuche in dreifacher Ausführung. Für die Analyse der IL-1 β - und TNF α -Produktion wurden Astrozyten (C, E) und Mikrogliazellen (D, F) mit den Bakterienüberständen von SP, SA, NM und PA für 0, 6, 12 und 24 h behandelt und anschließend die Zytokin-mRNA-Expression mittels der TaqMan *realtime* RT-PCR im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. 18s wurde als endogene Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Versuche in dreifacher Ausführung.

V DISKUSSION

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war die Frage, ob antimikrobielle Peptide im ZNS des Menschen eine Rolle bei der Beeinflussung pathologischer Veränderungen spielen. Zunächst wurde deshalb das Vorhandensein des humanen Cathelizidin LL-37 im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten, die an einer bakteriellen Meningitis erkrankt waren, untersucht. Weiterhin wurde die Beteiligung der Gliazellen an der Expression des Cathelizidins der Ratte, rCRAMP, *in vitro* und *in vivo* analysiert. Cathelizidine sind durch eine hochkonservierte N-terminale Cathelin Pro-Domäne und eine strukturell variable antimikrobielle Domäne am C-Terminus gekennzeichnet. In Nagetieren und dem Menschen konnte bisher nur ein Vertreter identifiziert werden, während in anderen Säugetieren wie dem Schwein oder Pferd mehrere Gene gefunden wurden (Zanetti, 2005). Das Cathelizidin der Ratte wird als rCRAMP bezeichnet. Bisher wurden das Vorhandensein und die Funktion der Cathelizidine hauptsächlich auf epithelialen Oberflächen und in neutrophilen Granulozyten untersucht. Insgesamt scheinen die Cathelizidine eine wichtige Rolle für die antimikrobielle Aktivität des angeborenen Immunsystems gegen Infektionen zu vermitteln (Termen et al., 2003).

Die Untersuchung des *Liquor cerebrospinalis* mittels ELISA zeigten eine deutliche Zunahme von LL-37 von ≈ 10 ng/ml in Patienten, die keine Infektion aufwiesen, auf ≈ 84 ng/ml in Patienten mit einer bakteriellen Meningitis (Abb. 1). Die Zunahme war auf das Liquorsystem beschränkt, denn im Serum konnte keine Erhöhung festgestellt werden. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass auch weitere AP durch die bakterielle Meningitis induziert werden. So konnte mittels HPLC eine Zunahme des humanen β -Defensins 2 nachgewiesen werden. Das bestätigt frühere Befunde, wonach hier eine Erhöhung von Defensinen und weiterhin des antibakteriellen Enzyms Lactoferrin im *Liquor cerebrospinalis* von Kindern, die an einer bakteriellen Meningitis erkrankt waren, gezeigt werden konnte (Maffei et al., 1999). Andererseits lassen unsere Ergebnisse den Schluß zu, dass die bakterielle Meningitis zu keiner generalisierten Erhöhung aller AP führt, denn für das humane β -Defensins 3 und das antibakterielle Enzym Lysozym konnten wir keine Zunahme nachweisen. Möglicherweise stellt die Zunahme des AP schon eine Pathogen-spezifische Antwort des angeborenen Immunsystems dar, was zukünftige Untersuchungen bestätigen sollten. In der Literatur finden sich jedenfalls Hinweise für eine Pathogen-spezifische Genexpression (Schubert-Unkmeir et al., 2009). Weiterhin scheinen aber die induzierten AP wie LL-37, humanes β -Defensins 2 oder Lactoferrin an der antibakteriellen Abwehr im *Liquor cerebrospinalis*

DISKUSSION

beteiligt zu sein, denn die Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität des LCS mittels Platten-Diffusionstest zeigen eine deutliche erhöhte Aktivität des Liquors aus Patienten mit einer bakteriellen Meningitis gegen die verwendeten Testkeime (Abb. 2). Die Ergebnisse bestätigen auch, dass Lysozym nicht an der erhöhten antibakteriellen Aktivität beteiligt ist, denn eine Hemmung von Lysozym mittels Antagonisten zeigte keinen Einfluß genauso wie eine Inhibition des Komplementsystems. Insgesamt zeigte der *Liquor cerebrospinalis* von Meningitis-Patienten eine antibakterielle Aktivität sowohl gegen Gram-positive (*Bacillus megaterium*) als auch gegen verschiedene Gram-negative *Escherichia coli*-Stämme. Für Cathelizidine konnte eine antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive und negative Bakterien nachgewiesen werden (Diamond et al., 2009). Hierbei konnte eine Korrelation zwischen der antibakteriellen Aktivität und der Cathelizidin-Struktur beobachtet werden, denn ein höheres Vorkommen der α -Helix-Konformation führte zu einer höheren antibakteriellen Aktivität (Johansson et al., 1998).

Für die Mechanismen der antibakteriellen Aktivität der AP gegen Mikroorganismen gibt es bisher einige Hypothesen und Erklärungen, aber die genauen Details sind nicht geklärt. Insgesamt sind die Ziele der AP besser verstanden. Erstens binden die positiv-geladenen kationischen AP an negativ-geladene zelluläre Membranen der Bakterienzellen, um Mizellenartige Aggregate zu bilden. Die Aggregate verursachen eine Zunahme der Membranpermeabilität, die zu einem Verlust von essentiellen Ionen und Nährstoffen führt, was den schnellen Zelltod zur Folge hat. Zweitens deutet eine Reihe von Hinweisen darauf hin, dass die Aktivität über intrazelluläre Ziele vermittelt wird nachdem die Membran durchlässiger wird. Die intrazelluläre Aktivität beinhaltet die Aktivierung von autolytischen Enzymen, die Hemmung der Zellwand-Biosynthese und die Synthese von DNA, RNA und Protein (Yeaman und Yount, 2003). Eine weitere interessante Eigenschaft der Cathelizidine stellt ihre Fähigkeit dar, bakterielle Zellwandbestandteile wie die Lipopolysaccharide zu binden und damit zu neutralisieren. Von der bisher *in vitro* gezeigten Eigenschaft erhofft sich die klinische Forschung in Zukunft eine Möglichkeit zu entwickeln, durch die exogene Administration der AP *in vivo* einen Schutz gegen Sepsis zu ermöglichen (Warren et al., 2003, van Groen et al., 2009).

Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse weiterhin einen Anstieg von LL-37 im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten, die an einer Virusenzephalitis erkrankt sind (Abb. 1), während im Liquor und Serum von Patienten mit viraler Meningitis kein Anstieg zu verzeichnen war. In dem Zusammenhang konnte für einige AP einschließlich der Cathelizidine gezeigt werden, dass sie die *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)-Replikation und Influenza-Virus-Infektion

DISKUSSION

blockieren können (Bergman et al., 2007). Als Mechanismen der AP für eine antivirale Aktivität wird vermutet, dass die AP das Eindringen der Viren in die Wirtszelle verhindern, indem die Virusproteine oder Zielrezeptoren, über welche unter anderem das Eindringen erfolgt, gehemmt werden (Salvatore et al., 2007). Insgesamt sind die zugrundeliegenden Mechanismen aber nicht klar und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Neben den *in vivo*-Untersuchungen des *Liquor cerebrospinalis* wurde in der vorliegenden Arbeit das Vorhandensein und die mögliche Rolle des Cathelizidins der Ratte in primären Gliazellen und einem Rattenmodell für die bakterielle Meningitis untersucht. Dabei konnten wir eine rCRAMP-Expression auf mRNA- und Proteinebene in Astrozyten als auch Mikrogliazellen *in vitro* nach einer Behandlung mit verschiedenen Bakterienüberständen nachweisen (Abb. 4). Die Ergebnisse konnten anschließend mittels Doppelfärbungen mit Markern für die Gliazellen nach einer *Streptococcus pneumoniae*-induzierten Meningitis in der Ratte verifiziert werden (Abb. 7). Für die Zunahme der Expression in den Gliazellen konnten verschiedene Signalwege verantwortlich gemacht werden. So führte eine Hemmung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase) und p38 sowie des wichtigen proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB zu einer Reduktion der rCRAMP-Expression (Abb. 9). Das bestätigt deren wichtige Funktion für die Regulation der angeborenen Immunantwort im ZNS. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Gliazellen an der rCRAMP-Expression nach einer Infektion beteiligt sind. Der Zeitverlauf der Expression zeigt dabei, dass rCRAMP in der frühen Phase der Infektion (bis 24 h) vermehrt induziert wird. Frühere Arbeiten untersuchten bisher nur die regionale Expression von rCRAMP anhand von primären Zellkulturen mit einer starken endogenen Expression im Hippokampus und Kleinhirn (Bergman et al., 2005). Andererseits identifizierten nachfolgende Arbeiten das Vorhandensein von rCRAMP in meningealen Zellen nach einer *Streptococcus pneumoniae*-induzierten Meningitis beziehungsweise dem Cathelizidin der Maus, CRAMP, in den Zellen der Blut-Hirn-Schranke und Meningen nach einer Infektion mit dem Gram-negativen Meningitis-Pathogen *Neisseria meningitidis* (Bergman et al., 2006, Brandenburg et al., 2009). Unsere eigenen Untersuchungen zeigen weiterhin, dass auch die Ependymzellen des für die Liquorsekretion verantwortlichen *Plexus choroideus* nach einer bakteriellen Infektion für die rCRAMP-Bildung verantwortlich sind (Abb. 8). Bei den Ependymzellen handelt es sich um eine Gruppe der Gliazellen. Insgesamt verdeutlichen damit die Ergebnisse, dass tatsächlich Zellen des ZNS an der AP-Produktion beteiligt sein können und auch eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort übernehmen können. Das wird dadurch unterstützt, dass die Ergebnisse zur antimikrobiellen Aktivität des Zellkultur-Überstandes von

DISKUSSION

Gliazellen eine signifikante Zunahme nach einer Behandlung der Zellen mit Bakterienüberständen zeigen. Dabei zeigten allerdings Mikrogliazellen eine deutliche stärkere und umfassendere Aktivität gegen verschiedene Gram-positive und -negative Testkeime als die Überstände von behandelten Astrozyten-Kulturen (Abb. 5 und 6).

Das entspricht ihrer Rolle als den Vertretern des monozytären Makrophagen-Phagozyten-Systems im ZNS. Ihre Bedeutung konnte für zahlreiche entzündliche und neurodegenerative Vorgänge im Gehirn gezeigt werden (Streit et al., 2004, Konat et al., 2006). Die Mikroglia-Zellen üben dabei die Funktion als ZNS-spezifische Makrophagen beziehungsweise Sensorzellen des angeborenen Immunsystems aus. Die Detektion von Pathogenen über die sogenannten Muster-Wiedererkennungsrezeptoren wie den Toll-like Rezeptoren (TLR) führt dazu, dass die Mikrogliazellen aktiviert werden und zum Ort der Entzündung/Verletzung wandern und dort akkumulieren. Die aktivierten Mikrogliazellen sezernieren wiederum eine breite Palette an pro-inflammatorischen Zytokinen, Enzymen und Adhäsionsmolekülen. Darüber wird eine verstärkte Leukozyten-Einwanderung durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS induziert. Insgesamt führt das zu einer Induktion und Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses (Konat et al., 2006). Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Behandlung der Mikroglia-Zellen mit den verschiedenen Bakterienüberständen zu einer massiven Zunahme der Expression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 β (IL-1 β) und dem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α ; Abb. 10), während im Tiermodell die Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* zu einer deutlichen Zunahme von Mikroglia-Zellen im ZNS führte (Abb. 7B).

Auf der anderen Seite sind Astrozyten die Hauptvertreter der Gliazellen im Gehirn. Sie sind maßgeblich an der Erhaltung der Homöostase des ZNS beteiligt, indem sie die Entstehung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen und kontrollieren. Sie produzieren vermehrt das Intermediärfilament GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), welcher als Marker für aktivierte Astrozyten dient (Bramanti et al., 2010). Weiterhin sind Astrozyten an der Erregungsübertragung an den Synapsen durch die Kontrolle des Ionen-Haushalts im Gehirn beteiligt. Darüber hinaus sind sie ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr des ZNS. Sie exprimieren ebenfalls Musterwiedererkennungsrezeptoren wie zum Beispiel den TLR2 oder 4, um darüber eindringende Keime zu detektieren. Über die Sezernierung von Zytokinen, Chemokinen können sie die Immunantwort aktivieren und beeinflussen (Konat et al., 2006). Unsere Untersuchungen konnten die massive Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α bestätigen (Abb. 10). Weiterhin wurde eine starke Zunahme der GFAP-Expression in den Gehirnen der infizierten Ratten nachgewiesen (Abb. 7B).

DISKUSSION

Interessanterweise zeigen unsere Untersuchungen aber auch, dass die Behandlung der Gliazellen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α zu einer Induktion der rCRAMP-Expression führt (Abb. 10). Für IL-10 konnte gezeigt werden, dass es die AP-Produktion herunterreguliert (Howell et al., 2005). Andererseits verdeutlichen andere Studien, dass AP wie auch rCRAMP selbst die Expression von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen induzieren und beeinflussen können (Zasloff, 2002, Brandenburg et al., 2010). Dazu modifizieren sie die pro- und antiinflammatorische Zytokinexpression, um so die Immunantwort zu modulieren. Die zahlreichen Befunde sprechen für eine wichtige immunmodulatorische Funktion der AP neben der antimikrobiellen Aktivität (Auvynet und Rosenstein, 2009). Dazu zählt weiterhin, dass die AP einschließlich der Cathelizidine für Immun- und Nicht-Immunzellen eine chemotaktische Aktivität besitzen. Für das humane LL-37 konnte hierbei eine Chemotaxis von Monozyten, T-Zellen und neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden, also Zellen des angeborenen wie spezifischen Immunsystems (Lai und Gallo, 2009). Neben der chemotaktischen Aktivität induzieren weiterhin Defensine eine Mastzellaktivierung einschließlich einer zunehmenden Prostaglandin D2-Produktion und intrazellulären Ca²⁺ Mobilisierung (Iribarren et al., 2007). Aber auch die Zellen der spezifischen Immunantwort werden in ihrer Funktion beeinflusst, indem sie an der Reifung von dendritischen Zellen beteiligt sind. Darüber kommt es zu einer verbesserten Antigen-Präsentation und anschließenden T- und B-Zellreifung (Davidson et al., 2004, Kin et al., 2011). Daneben konnten aber auch eine Beteiligung der AP an der Wundheilung, Aufrechterhaltung der Hautbarriere, Gefäßbildung und möglichen Anti-Krebs-Aktivität gezeigt werden (Yeung et al., 2011).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von LL-37 / rCRAMP für die angeborene Immunantwort des Gehirns. Es konnte eine signifikante Beteiligung sowohl der Astrozyten als auch der Mikrogliazellen an der rCRAMP-Expression und die dafür verantwortlichen Signalwege nachgewiesen werden. Die Befunde verdeutlichen die Schlüsselrolle der angeborenen Immunantwort für die Infektabwehr im ZNS oder bei neuroinflammatorischen Prozessen.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die Meningitis ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, welche durch die Entzündung der Hirnhäute charakterisiert ist. Auf die bakterielle Infektion reagiert das körpereigene Immunsystem unter anderem mit der Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AP). Diese antimikrobiellen Peptide besitzen ähnlich wie Antibiotika die Fähigkeit pathogene Mikroorganismen abzutöten. Aufgrund dessen spielen sie eine immer größer werdende Rolle in der Forschung für alternative Therapieansätze bei bakteriellen Infektionen. Mit der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein von AP im Liquor cerebrospinalis (LCS) von Patienten mit einer bakteriellen Meningitis mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* untersucht. Weiterhin wurde die antimikrobielle Aktivität des LCS im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen im Platten-Diffusionstest bestimmt. Daneben wurden die zelluläre Expression und Sekretion des *cathelin-related antimicrobial peptide* der Ratte (rCRAMP; Ratten-Cathelizidin) sowie die bakteriziden Eigenschaften der Zellkultur-Überstände von primären Gliazellen (Astrozyten und Mikrogliazellen) aus der Ratte nach der Behandlung mit verschiedenen Bakterien-Überständen von Meningitis-Keimen mittels *realtime* RT-PCR, Western Blot und Platten-Diffusionstest untersucht. Anhand eines experimentellen Meningitis-Modells in der Ratte wurden die rCRAMP-Expression *in vivo* in den Gliazellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Außerdem wurde die Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege und der Zusammenhang der Expression mit proinflammatorischen Zytokinen untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine starke Zunahme des humanen Cathelizidins LL-37 im LCS und damit einhergehend eine höhere antimikrobielle Aktivität des LCS von Patienten mit bakterieller Meningitis im Vergleich zu nicht infizierten LCS-Proben und Serum. Ebenfalls konnte eine starke Zunahme der Expression und Sekretion von rCRAMP in mit Bakterien-Überständen behandelten Astrozyten als auch Mikroglia-Zellen nachgewiesen werden. Die Zellkultur-Überstände zeigten eine deutliche Zunahme der antimikrobiellen Aktivität gegen verschiedene Testkeime. Die Zunahme der rCRAMP-Expression in den Gliazellen konnte in den Hirnschnitten der infizierten Ratten verifiziert werden. Für die Vermittlung der Expression konnten verschiedene Signaltransduktionswege und proinflammatorische Zytokine (Interleukin 1 β und Tumor-Nekrose-Faktor- α) verantwortlich gemacht werden. Insgesamt lassen unsere Ergebnisse auf eine wichtige Rolle der AP in der angeborenen Immunantwort nach einer bakteriellen Infektion im Gehirn schließen. Die Gliazellen sind dabei durch die Produktion der AP an der Immunabwehr beteiligt.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Auvynet, C. and Rosenstein, Y., 2009. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *Febs J.* 276, 6497-6508.
- Bals, R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* 1, 141-150.
- Bechmann, I., Galea, I. and Perry, V. H., 2007. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 28, 5-11.
- Bergman, P., Johansson, L., Wan, H., Jones, A., Gallo, R. L., Gudmundsson, G. H., Hokfelt, T., Jonsson, A. B. and Agerberth, B., 2006. Induction of the antimicrobial peptide CRAMP in the blood-brain barrier and meninges after meningococcal infection. *Infect Immun.* 74, 6982-6991.
- Bergman, P., Termen, S., Johansson, L., Nystrom, L., Arenas, E., Jonsson, A. B., Hokfelt, T., Gudmundsson, G. H. and Agerberth, B., 2005. The antimicrobial peptide rCRAMP is present in the central nervous system of the rat. *J Neurochem.* 93, 1132-1140.
- Bergman, P., Walter-Jallow, L., Broliden, K., Agerberth, B. and Soderlund, J., 2007. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr HIV Res.* 5, 410-415.
- Bramanti, V., Tomassoni, D., Avitabile, M., Amenta, F. and Avola, R., 2010. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed).* 2, 558-570.
- Brandenburg, L. O., Jansen, S., Wruck, C. J., Lucius, R. and Pufe, T., 2010. Antimicrobial peptide rCRAMP induced glial cell activation through P2Y receptor signalling pathways. *Mol Immunol.* 47, 1905-1913.
- Brandenburg, L. O., Varoga, D., Nicolaeva, N., Leib, S. L., Podschun, R., Wruck, C. J., Wilms, H., Lucius, R. and Pufe, T., 2009. Expression and regulation of antimicrobial peptide rCRAMP after bacterial infection in primary rat meningeal cells. *J Neuroimmunol.* 217, 55-64.
- Brogden, K. A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3, 238-250.
- Bucki, R., Leszczynska, K., Namiot, A. and Sokolowski, W., 2010. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 58, 15-25.
- Byfield, F. J., Kowalski, M., Cruz, K., Leszczynska, K., Namiot, A., Savage, P. B., Bucki, R. and Janmey, P. A., 2011. Cathelicidin LL-37 increases lung epithelial cell stiffness, decreases transepithelial permeability, and prevents epithelial invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol.* 187, 6402-6409.
- Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S., Bowdish, D. M., MacDonald, K. L., Ma, R. C., Hancock, R. E. and Speert, D. P., 2004. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol.* 172, 1146-1156.
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. and Kisich, K. O., 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des.* 15, 2377-2392.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H. and Gudmundsson, G. H., 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem.* 272, 15258-15263.
- Gallo, R. L., Kim, K. J., Bernfield, M., Kozak, C. A., Zanetti, M., Merluzzi, L. and Gennaro, R., 1997. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem.* 272, 13088-13093.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 3, 710-720.
- Ginsberg, L., 2004. Difficult and recurrent meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75 Suppl 1, i16-21.
- Gordon, Y. J., Huang, L. C., Romanowski, E. G., Yates, K. A., Proske, R. J. and McDermott, A. M., 2005. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res.* 30, 385-394.
- Hiratsuka, T., Nakazato, M., Date, Y., Mukae, H. and Matsukura, S., 2001. Nucleotide sequence and expression of rat beta-defensin-1: its significance in diabetic rodent models. *Nephron.* 88, 65-70.
- Howell, M. D., Novak, N., Bieber, T., Pastore, S., Girolomoni, G., Boguniewicz, M., Streib, J., Wong, C., Gallo, R. L. and Leung, D. Y., 2005. Interleukin-10 downregulates antimicrobial peptide expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 125, 738-745.
- Huttner, K. M. and Bevins, C. L., 1999. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res.* 45, 785-794.
- Iribarren, P., Chen, K., Gong, W., Cho, E. H., Lockett, S., Uranchimeg, B. and Wang, J. M., 2007. Interleukin 10 and TNFalpha synergistically enhance the expression of the G protein-coupled formylpeptide receptor 2 in microglia. *Neurobiol Dis.* 27, 90-98.
- Johansson, J., Gudmundsson, G. H., Rottenberg, M. E., Berndt, K. D. and Agerberth, B., 1998. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem.* 273, 3718-3724.
- Kai-Larsen, Y. and Agerberth, B., 2008. The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. *Front Biosci.* 13, 3760-3767.
- Kim, K. S., 2003. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci.* 4, 376-385.
- Kin, N. W., Chen, Y., Stefanov, E. K., Gallo, R. L. and Kearney, J. F., 2011. Cathelin-related antimicrobial peptide differentially regulates T- and B-cell function. *Eur J Immunol.* 41, 3006-3016.
- Kofler, J. and Wiley, C. A., 2011. Microglia: key innate immune cells of the brain. *Toxicol Pathol.* 39, 103-114.
- Konat, G. W., Kielian, T. and Marriott, I., 2006. The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. *J Neurochem.* 99, 1-12.
- Kopp, E. B. and Medzhitov, R., 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 11, 13-18.
- Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S., 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 30, 16-34.
- Lai, Y. and Gallo, R. L., 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30, 131-141.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A. and Klein, W. L., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 6448-6453.
- Laporte, V., Lombard, Y., Levy-Benezra, R., Tranchant, C., Poindron, P. and Warter, J. M., 2004. Uptake of Abeta 1-40- and Abeta 1-42-coated yeast by microglial cells: a role for LRP. *J Leukoc Biol.* 76, 451-461.
- Lien, E. and Ingalls, R. R., 2002. Toll-like receptors. *Crit Care Med.* 30, S1-11.
- Maffei, F. A., Heine, R. P., Whalen, M. J., Mortimer, L. F. and Carcillo, J. A., 1999. Levels of antimicrobial molecules defensin and lactoferrin are elevated in the cerebrospinal fluid of children with meningitis. *Pediatrics.* 103, 987-992.

LITERATURVERZEICHNIS

- Nagaoka, I., Hirota, S., Yomogida, S., Ohwada, A. and Hirata, M., 2000. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res.* 49, 73-79.
- Ransohoff, R. M., Kivisakk, P. and Kidd, G., 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 3, 569-581.
- Redzic, Z., 2011. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS.* 8, 3.
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E. and Aderem, A., 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 9577-9582.
- Rosenberger, C. M., Gallo, R. L. and Finlay, B. B., 2004. Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 2422-2427.
- Saez-Llorens, X. and McCracken, G. H., Jr., 2003. Bacterial meningitis in children. *Lancet.* 361, 2139-2148.
- Salvatore, M., Garcia-Sastre, A., Ruchala, P., Lehrer, R. I., Chang, T. and Klotman, M. E., 2007. alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s). *J Infect Dis.* 196, 835-843.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 1813, 878-888.
- Schubert-Unkmeir, A., Slanina, H. and Frosch, M., 2009. Mammalian cell transcriptome in response to meningitis-causing pathogens. *Expert Rev Mol Diagn.* 9, 833-842.
- Sochacki, K. A., Barns, K. J., Bucki, R. and Weisshaar, J. C., 2011. Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, E77-81.
- Sorensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S. and Borregaard, N., 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood.* 97, 3951-3959.
- Spencer, J. H., 1992. Antimicrobial peptides of frog skin. *Adv Enzyme Regul.* 32, 117-129.
- Streit, W. J., Mrak, R. E. and Griffin, W. S., 2004. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation.* 1, 14.
- Su, Y., Zhang, K. and Schluesener, H. J., 2010. Antimicrobial peptides in the brain. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 58, 365-377.
- Termen, S., Tollin, M., Olsson, B., Svenberg, T., Agerberth, B. and Gudmundsson, G. H., 2003. Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci.* 60, 536-549.
- Tunkel, A. R., Hartman, B. J., Kaplan, S. L., Kaufman, B. A., Roos, K. L., Scheld, W. M. and Whitley, R. J., 2004. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis.* 39, 1267-1284.
- van de Beek, D., de Gans, J., Spanjaard, L., Weisfelt, M., Reitsma, J. B. and Vermeulen, M., 2004. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med.* 351, 1849-1859.
- van Deuren, M., Brandtzaeg, P. and van der Meer, J. W., 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev.* 13, 144-166, table of contents.
- van Groen, T., Kadish, I., Wiesehan, K., Funke, S. A. and Willbold, D., 2009. In vitro and in vivo staining characteristics of small, fluorescent, Abeta42-binding D-enantiomeric peptides in transgenic AD mouse models. *ChemMedChem.* 4, 276-282.
- Varoga, D., Paulsen, F. P., Kohrs, S., Grohmann, S., Lippross, S., Mentlein, R., Tillmann, B. N., Goldring, M. B., Besch, L. and Pufe, T., 2006. Expression and regulation of human beta-defensin-2 in osteoarthritic cartilage. *J Pathol.* 209, 166-173.

LITERATURVERZEICHNIS

- Varoga, D., Pufe, T., Mentlein, R., Kohrs, S., Grohmann, S., Tillmann, B., Hassenpflug, J. and Paulsen, F., 2005. Expression and regulation of antimicrobial peptides in articular joints. *Ann Anat.* 187, 499-508.
- Warren, H. S., Matyal, R., Allaire, J. E., Yarmush, D., Loisel, P., Hellman, J., Paton, B. G. and Fink, M. P., 2003. Protective efficacy of CAP18106-138-immunoglobulin G in sepsis. *J Infect Dis.* 188, 1382-1393.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S. and Couraud, P. O., 2009. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1788, 842-857.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R. and Hancock, R. E., 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 38, 7235-7242.
- Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D. and Schmidt, A. M., 1996. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 382, 685-691.
- Yang, C. N., Shiao, Y. J., Shie, F. S., Guo, B. S., Chen, P. H., Cho, C. Y., Chen, Y. J., Huang, F. L. and Tsay, H. J., 2011. Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naive primary microglia. *Neurobiol Dis.* 42, 221-230.
- Yeaman, M. R. and Yount, N. Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 55, 27-55.
- Yeung, A. T., Gellatly, S. L. and Hancock, R. E., 2011. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol Life Sci.* 68, 2161-2176.
- Zaiou, M., Nizet, V. and Gallo, R. L., 2003. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol.* 120, 810-816.
- Zanetti, M., 2005. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol.* 7, 179-196.
- Zasloff, M., 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 5449-5453.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415, 389-395.

ABKÜRZUNGEN

VIII ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AP	Antimikrobielle Peptide
BHS	Blut-Hirnschranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
ca	circa
cDNA	copy DNA
CRAMP	<i>cathelicidin related antimicrobial peptide</i>
DNA	Desoxyribunleinsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FKS	Fötales Kälberserum
HBD-1,2	Humanen β -Defensin-1,2
IL-1 β	Interleukin-1 β
LCS	<i>Liquor cerebrospinalis</i>
LL-37	humanes Cathelizidin
LPS	Lipopolysaccharide
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mg	Mikrogramm
min	Minute
mL	Milliliter
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
NM	<i>Neissera meningitis</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
ZNS	Zentrales Nervensystem

DANKSAGUNG

IX DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich recht herzlich Herrn Professor Dr. rer. nat. Ralph Lucius für die Vergabe des hochinteressanten Promotionsthemas danken. Herrn Dr. med. dent. M. Auyb danke ich für den ausschlaggebenden Ratschlag, mich im Anatomischen Institut als Doktorandin zu bewerben. Und für die Möglichkeit das Projekt durchzuführen und für die Überlassung des Arbeitsplatzes danke ich ebenfalls recht herzlich Herrn Professor Dr. med. Jobst Sievers.

Allerdings wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen ohne die außergewöhnliche Unterstützung von Herrn Dr. rer. nat. Lars-Ove Brandenburg, der mir nicht nur während des praktischen Teils im Labor, sondern auch während der Zusammenfassung der Ergebnisse stets mit wertvollen Ratschlägen und viel Geduld zur Seite stand. An dieser Stelle ein ganz besonderer Dank für die unermüdliche Betreuung!

Nicht weniger intensiv war auch die Hilfsbereitschaft der medizinisch-technischen Assistentinnen des Anatomischen Instituts. Dabei möchte ich besonders Frau Rosemarie Sprang und Frau Regine Worm hervorheben. Die gemeinsamen spannenden Zeiten im Labor werden mir stets in guter Erinnerung bleiben. An dieser Stelle ein recht herzlicher Dank für die exzellente labortechnische Unterstützung!

Insbesondere möchte ich auf diesem offiziellen Wege meiner Großmutter Dr. med. Stefka Petrova danken, die mir nicht nur das Studium und die Promotion ermöglicht hat, sondern die mir auch stets mit ihren Fachkenntnissen und unermüdlicher Euphorie selbst in den schwierigsten Phasen zur Seite stand und mich immer wieder aufgebaut hat. Blagodaria za vsichko, babe!

LEBENS LAUF

X LEBENS LAUF

Name

Nicoletta Nicolaeva

Geburtsdatum

28. August 1983

Staatsangehörigkeit

BRD

Schulbildung:

1990-1997 Schulbildung in Haskovo, Bulgarien

1997-2002 Abitur am „**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gymnasium**“, Haskovo Bulgarien, Intensivunterricht: Biologie, Chemie, Deutsch

Beruflicher Werdegang :

2003-2008 Zahnmedizinstudium an der **Christian-Albrechts-universität** Kiel, Schleswig-Holstein

2006-2007 Doktorarbeit zur Erlangung des Akademischen Grades Dr. med. dent. am **Anatomischen Institut**, CAU-Kiel

2006 -2007 Wissenschaftliche Hilfskraft am **Anatomischen Institut**, CAU-Kiel

März 2007 Famulatur am **Städtischen Krankenhaus “Dr. Atanas Dafovski”AG**, Kardzhali, Bulgarien

August 2007 Famulatur an der **Staatlichen Psychiatrischen Klinik, Stomatologische Abteilung**, Kardzhali, Bulgarien. Supervision durch Dr. med. dent. S. Nikolova; Betreuung von schwerbehinderten und emotional instabilen Patienten

September 2008 - September 2010

Assistentenzeit im „**Zentrum für Zahngesundheit**“ Dr.Becker, Dr. Holtorf & Partner, Bad Segeberg

Oktober 2010 – März 2011

Juniorpartner in der „**Gemeinschaftspraxis für Zahngesundheit, Dr. Rupprecht / Nicolaeva**“, Moislinger Allee 15, 23558 Lübeck

Seit April 2011

Angestellte Zahnärztin in Bremen

Ab Oktober 2011 bis August 2012

Spezialisierung, Tätigkeitsschwerpunkt Implantologie „**International Curriculum Implantology**“, MKG-Chirurgie in Kiel

VERÖFFENTLICHUNGEN

Mitglied der:

DGZMK, Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde

DGI, Deutsche Gesellschaft für Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich

Young Dentist

XI VERÖFFENTLICHUNGEN

Brandenburg, L.O., Varoga, D., **Nicolaeva, N.**, Leib, S.L., Wilms, H., Podschun, R., Wruck, C.J., Schroeder, J.M., Pufe, T. and Lucius, R. (2008) Role of glial cells in the functional expression of the antimicrobial peptide LL-37/rCRAMP in meningitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67**, 1041-54.

Brandenburg, L.O., Varoga, D., **Nicolaeva, N.**, Leib, S.L., Podschun, R., Wruck, C.J., Wilms, H., Lucius, R. and Pufe, T. (2009) Expression and regulation of antimicrobial peptide rCRAMP after bacterial infection in primary rat meningeal cells. *J. Neuroimmunol.* **217**, 55-64.

XII POSTERPRÄSENTATIONEN

Induction of antimicrobial peptide rCRAMP by bacterial components in glial cells. (Poster)

Brandenburg, L.O., Varoga, D., **Nikolaeva, N.**, Leib, S.L., Wilms, H., Podschun, R., Pufe, T., Deuschl, G., Wruck, C., Sievers, J., Lucius, R. 102. Tagung der Anatomischen Gesellschaft in Gießen, April 2007