

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Horst Lorenz Fehm

**Promotoranalyse des Humanen Beta Defensin 2
bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -
vorgelegt von
Michael Helmut Steppat
aus Bonn

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Diether Ludwig

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Brühl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.10.2005

Gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
- Dekan der Medizinischen Universität -

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	12
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	12
1.2 Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	12
1.3 Antimikrobielle Peptide	17
1.4 Defensinexpression im Kolon bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	18
1.5 Fragestellung	19
2 Materialien und Geräte	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Materialien	22
2.1.3 Kits und Reagentien für die Sequenzierung	23
2.1.4 Kits	24
2.1.5 Enzyme	24
2.1.6 Verwendete Zelllinie	24
2.2 Verwendete Geräte	25
2.3 Stammlösungen	26

3 Methoden	27
3.1 Vorversuche und Patientenkollektive	27
3.2 Molekularbiologische Basismethoden	27
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
3.2.2 Gelelektrophorese	29
3.2.3 Klonierung von PCR-Produkten	30
3.2.4 DNA-Präparation (Mini-Prep/Maxi-Prep)	31
3.3 Versuchsteil I: PCR, Klonierung und Sequenzierung	33
3.3.1 Isolation von Nukleinsäuren	33
3.3.2 Generierung der Matrizen für die Sequenzierung	35
3.3.3 Zyklus-Sequenzierung (thermal cycle sequencing)	37
3.3.4 Auswertung der Ergebnisse	38
3.4 Versuchsteil IIa: Generierung von Reporterplasmiden	39
3.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.4.2 Klonierung von PCR-Produkten	41
3.4.3 Restriktionsverdauungen	41
3.4.4 Elution von DNA aus Agarosegelen	41
3.4.5 Ligation von DNA	42
3.4.6 Rekombination von Reportervektoren	43
3.5 Versuchsteil IIb: Reporterassay	44
3.5.1 Kultivierung von HeLa-Zellen	44
3.5.2 Elektroporation	45
3.5.3 Stimulation der HeLa-Zellen mit TNF α	46
3.5.4 Dual-Luciferase-Assay	46
3.5.5 Auswertung der Ergebnisse	47

4 Ergebnisse	48
4.1 Ergebnisse der Sequenzierung	48
4.2 Reporterassay	51
4.2.1 Analyse der Aktivität des unmutierten Promotorfragmentes	51
4.2.2 Analyse der Aktivität eines Promotorfragmentes mit einem Basenaustausch an Position 2257	54
4.2.3 Zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse der Dual-Luciferase-Assays	55
4.2.4 Darstellung der Relation der Aktivität stimulierter Zellen zu der nicht stimulierter Zellen	56
5 Diskussion	57
5.1 Struktur des HBD 2-Gens und Erläuterung der Ergebnisse der Sequenzierung	58
5.2 Nuclear Factor kappa B (NFκB)	60
5.3 Genregulation des HBD 2	61
6 Zusammenfassung	65
7 Literaturverzeichnis	67
8 Anhänge	74
8.1 Anhang 1: Ergebnisse der Sequenzierung	74
8.2 Anhang 2: Dual-Luciferase-Assay (Versuche 1 und 2)	85
8.3 Anhang 3: Dual-Luciferase-Assay (Versuche 4 und 5)	86

9 Danksagungen	87
10 Publikationsliste	88
11 Lebenslauf	89

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung der sequenzierten Promotorfragmente	48
Abbildung 2: Auffällige Basenabweichungen in der Sequenzierung	50
Abbildung 3: Schematische Darstellung der untersuchten Promotorfragmente	51
Abbildung 4: Ergebnis eines Dual-Luciferase-Assays (Versuch 3) mit unmutierten Promotorfragmenten	53
Abbildung 5: Ergebnis eines Dual-Luciferase-Assays (Versuch 6) mit mutiertem Promotorfragment	54
Abbildung 6: Ergebnis der Dual-Luciferase-Assays	55
Abbildung 7: Induktion von Luciferaseaktivität durch TNFalpha	56
Abbildung 8: HBD 2-Genstruktur nach Harder (Harder <i>et al.</i> , 2000)	58

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Basenfolge der verwendeten Primer	29
Tabelle 2: PCR-Protokoll für das GAPDH-Gen	34
Tabelle 3: PCR-Protokolle für die Fragmente HBD 2-Pro1, -Pro2 und -ProG	36
Tabelle 4: Protokoll der Zyklus-PCR	38
Tabelle 5: PCR-Protokolle für die Fragmente HBD 2-Luc1, -Luc2 und -Luc3	40

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin oder Adenosin
A	Ampere
abs.	Absolut
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
C	Celsius
C	Cytosin oder Cytidin
CARD	Caspase activation recruitment domain
CD	Cluster of differentiation
Da	Dalton
ddA	Didesoxyadenosin
ddC	Didesoxycytidin
ddG	Didesoxyguanosin
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ddT	Didesoxythymidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum
FliC	Flagella filament protein
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin oder Guanosin
G418	Aminoglycosidantibiotikum Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
h	Stunde
HBD	Humanes Beta Defensin
HD	Humanes Defensin

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HNP	Humanes Neutrophiles Peptid
IKK	IκB kinase komplex
IL	Interleukin
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol*l ⁻¹
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
NF	Nuclear factor
NOD	Nucleotide binding and oligomerization domain
p. a.	Pro analysi
pANCA	Antineutrophiler cytoplasmatischer Antikörper mit perinukleärem Fluoreszenzmuster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SSB	Single-stranded DNA binding protein
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin oder Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	Tracheal antimicrobial peptide
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
TE	Tris-EDTA
TEC	Tracheal epithelial cells
TLR	Toll-like receptor

TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volume/volume
W	Watt
w/o	Ohne
w/v	Weight/volume

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen umfasst als Hauptentitäten die Colitis ulcerosa und den Morbus Crohn.

Die Colitis ulcerosa ist eine distal vom Rektum ausgehende und sich von dort aus kontinuierlich auf das Kolon ausdehnende entzündliche Erkrankung der Mukosa. Sie ist gekennzeichnet durch Ulzerationen der oberflächlichen Schleimhautschichten. Der Morbus Crohn ist eine diskontinuierlich auftretende Entzündung des gesamten Gastrointestinaltraktes, die alle Schichten der Schleimhaut betrifft und mit Fistel- und Abszessbildung einhergehen kann. Häufigste Lokalisation ist das terminale Ileum und das proximale Kolon. Histologisch lassen sich häufig Granulome nachweisen. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch ihren schubweisen Verlauf aus. Weiterhin können sie sich extraintestinal, vor allem an Haut, Augen, Gelenken und Leber manifestieren. Als Komplikationen sind das Malabsorptionssyndrom, Wachstumsstörungen bei Kindern, zum Ileus führende Darmstenosen, Darmperforationen, das toxische Megakolon, starke Blutungen, die selten auftretende Amyloidose und besonders das Kolonkarzinom gefürchtet (Brüning, 1999, Fleig, 1999).

1.2 Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bisher unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung. Die klassische Einteilung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die durch Definition von Subtypen weiter spezifiziert wurde, wird in letzter Zeit mehr und mehr durch Ergebnisse genetischer Analysen in Frage gestellt (Ahmad *et al.*, 2001).

Derzeit geht man davon aus, dass die Symptomkomplexe, die sich klinisch als chronisch entzündliche Darmerkrankungen manifestieren, durch das Zusammenspiel einer Reihe verschiedener Faktoren bedingt sind. So gibt es Daten, die nahe legen, dass pränatale

Infektionen, Stillen, Infektionen in der Kindheit, Nikotinkonsum, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, Hygiene, Ernährungsgewohnheiten, aber auch soziale Komponenten wie die Ausbildung oder psychosomatische Aspekte wie Stress einen Einfluss auf die Ausbildung und den Verlauf einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung haben (Fiocchi, 1998).

Neben diesen Beobachtungen weiß man durch Familienstudien, dass in der Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankung auch die Genetik eine große Rolle spielt. Zwar ist keine einfache Mendelsche Vererbung für das Entstehen eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa verantwortlich, aber vor allem die Tatsache, dass eineiige Zwillinge eine signifikant höhere Konkordanz bezüglich des Auftretens chronisch entzündlicher Darmerkrankungen aufweisen als zweieiige Zwillinge (Ahmad *et al.*, 2001, Farrell und Peppercorn, 2002, Tysk *et al.* 1991) zeigt, dass neben Umgebungsfaktoren eine genetische Prädisposition wichtig ist. Die Konkordanzniveaus betragen 6-14% für die Colitis ulcerosa und 44-50% für den Morbus Crohn. Demzufolge scheint die Colitis ulcerosa stärker von Umgebungsfaktoren abhängig zu sein (Farrell und Peppercorn, 2002).

Als genetisch prädisponierend für das Auftreten einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung werden einige Polymorphismen diskutiert. Dabei gilt es zu beachten, dass Mutationen in verschiedenen Genen zu sehr ähnlichen Phänotypen führen können. Derzeit vermutet man, dass es auf molekularer Ebene eine Reihe unterschiedlicher Dysfunktionen gibt, die genetisch determiniert sind, durch Umgebungsfaktoren getriggert werden und sich dann klinisch als chronisch entzündliche Darmerkrankung manifestieren (Ahmad *et al.*, 2001). Durch Kopplungsanalysen ermittelte man Regionen, die entweder Empfänglichkeit für die Colitis ulcerosa und den Morbus Crohn, oder nur für eine der Krankheiten determinieren. Die Ergebnisse waren nicht alle replizierbar und müssen vorsichtig interpretiert werden, aber dennoch stützen sie die These von verschiedenen genetisch bedingten Defekten als Ursache des klinisch vielgestaltigen Krankheitsbildes. Die bisher beschriebenen Kopplungszonen liegen auf den Chromosomen 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16 und 21 und enthalten eine Reihe von Kandidatengenen, deren Defekt im Rahmen der Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen könnte (Ahmad *et al.*, 2001). 2001 veröffentlichten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Ergebnisse, die belegen, dass eine Leserasterverschiebung im NOD2-Gen (nucleotide binding and oligomerization domain) mit einer Empfänglichkeit für Morbus

Crohn assoziiert ist (Hugot *et al.*, 2001, Ogura *et al.*, 2001). Das NOD2-Gen liegt auf Chromosom 16 in einer Kopplungszone, in der auch andere Genloci liegen sollen, in denen eine Mutation mit einer erhöhten Empfänglichkeit für chronisch entzündliche Darmerkrankungen verbunden sein soll (Hampe *et al.*, 2002). Das Genprodukt von NOD2, ein intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Bestandteile, führt zu einer Aktivierung von Nuclear Factor kappa B (NFκB) und steigert die Induktion von NFκB durch Lipopolysaccharide (LPS) (Ogura *et al.*, 2001). NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der physiologischerweise unter anderem durch Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) oder LPS aktiviert wird, sich im Zellkern an spezifische Bindungsstellen anlagert und die Transkription von Entzündungsgenen reguliert (Schreiber, 1999). Die Mutation im NOD2-Gen trat in zwei bisher untersuchten deutschen und britischen Kollektiven bei 6,5% der Patienten mit Morbus Crohn homozygot auf, so dass der Mutation bisher eine geschätzte Bedeutung von 18% für das genetische Risiko der Erkrankung zugeordnet wird (Hampe *et al.*, 2001). Bei der Colitis ulcerosa scheint dieses Gen nicht von Bedeutung zu sein.

Ein weiteres viel diskutiertes Feld in der Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist die Frage, ob es sich bei der Entzündung um eine physiologische Reaktion des Darmes auf einen pathogenen Stimulus oder um eine entgleiste Reaktion auf einen physiologischen Reiz handelt. Bisher konnte kein Mikroorganismus identifiziert werden, der für das Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen verantwortlich gemacht werden kann, und die nachgewiesenermaßen erhöhten Antikörpertiter (Blaser *et al.*, 1984) der Patienten lassen sich als sekundäre Reaktion des Organismus im Rahmen der Entzündung interpretieren. Die bakterielle Besiedlung des Dickdarmes bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeichnet sich durch hohe Bakterienkonzentrationen aus, besonders bei Patienten mit Morbus Crohn. Die Zusammensetzung der bakteriellen Flora unterscheidet sich allerdings nicht signifikant von der bei Kontrollpatienten (Swidinski *et al.*, 2002). Die Beobachtung, dass im dem Stuhlfluss nicht ausgesetzten Darm nach Anlage eines endständigen Ileostomas bei Patienten mit Morbus Crohn die Entzündung abklingt und erst nach Reanastomosierung des Darmes wieder eine neue Entzündung auftritt (D'Haens *et al.*, 1998), verdeutlicht den Einfluss, den der Stuhlfluss und die damit verbundene Stimulation

des Darmes durch die kommensalen Bakterien für Auslösung und Aufrechterhaltung der Entzündung haben (Carter *et al.*, 2001).

Im Rahmen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung sind alle intestinalen Zellen in die Erkrankung einbezogen. Mesenchymale Zellen wie Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzellen und die Zellen der intramuralen Nervenplexus als Verbindungsglied zwischen neuroendokrinem System und Darm sind ebenso in ihrer Funktion verändert (Fiocchi, 1998) wie die Epithelzellen. Diese unterhalten die Entzündung durch ihre zu einer gesteigerten Immunreaktion führenden erhöhten Permeabilität für Antigene, die Freisetzung proinflammatorischer Substanzen und ihre Rolle als antigenpräsentierende Zellen (Panes, 2001). Das Endothel des intestinalen Gefäßsystems ist, wahrscheinlich als sekundäre Reaktion auf die Entzündung, ebenfalls geschädigt und trägt, eventuell durch seine gesteigerte Bindungsfähigkeit für Leukozyten, zur Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung bei (Binion *et al.*, 1997, 1998).

Die Aktivität der mukosalen T-Zellen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigt einige Auffälligkeiten. Die Makrophagen der Lamina propria von Patienten mit Morbus Crohn produzieren vermehrt Interleukin-12 (IL-12), ihre Lamina-propria-T-Zellen vermehrt Interferon γ . Dies wird im Rahmen einer typischen T-Helfer-1-Zell Antwort interpretiert. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa liegt eine verstärkte IL-5-Ausschüttung vor, die trotz bisher nicht nachgewiesener IL-4-Überproduktion als Bestandteil einer T-Helfer-2-Zell Antwort gesehen wird. Beide Immunreaktionen gelten als fehlregulierte T-Zell-Antworten auf Antigene der intestinalen Mikroflora. Die gestörten Immunreaktionen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen versucht man durch Antikörper gegen zentrale Zytokine der die Entzündung unterhaltenden Zytokinkaskaden zu durchbrechen. Diese Ansätze führen in Tiermodellen zu einer Remission der Entzündung (Blumberg und Strober, 2001).

Zusätzlich zu den Auffälligkeiten bei den immunregulatorischen Zytokinen scheinen die proinflammatorischen Zytokine IL-1, -6, -8 und TNF α bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht zu sein (Fiocchi, 1998) und Anti-TNF α -Antikörper werden bereits in der Klinik als potentes Therapeutikum bei Vorliegen eines Morbus Crohn genutzt (Targan *et al.*, 1997, van Deventer, 1997).

Auch eine Autoimmunreaktion als ursächlicher Faktor chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist weiterhin in der Diskussion, und auch auf diesem Gebiet gibt es viel versprechende Ansätze. So kommen im Serum von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verschiedene Autoantikörper, zum Beispiel gegen Bestandteile des Cytoskelettes oder des Dickdarmes vor, diese sind aber nicht spezifisch und für sie ist bisher kein pathogenetischer Zusammenhang zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen (Fiocchi, 1998). Ca. 70% der Patienten mit Colitis ulcerosa weisen pANCA auf, und auch andere autoimmune Proteine treten bei der Colitis ulcerosa deutlich häufiger auf als beim Morbus Crohn, so dass bei der Colitis ulcerosa ein Zusammenwirken von Autoimmun- und Umgebungsfaktoren im Vordergrund zu stehen scheint (Farrell *et al.*, 2002). Die bei Patienten mit Colitis ulcerosa vermutete T-Helfer-2-Zell Immunantwort passt gut in diesen Kontext, da mit Colitis ulcerosa assoziierte Autoantikörper eine solche zur Aktivierung benötigen (Blumberg und Strober, 2001).

Das wichtigste Standbein der Standardtherapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist eine Immunsuppression, die die fehlregulierte Immunreaktion des Organismus auf die Darmflora (Shanahan, 2001) bremsen soll. Ein neuer therapeutischer Ansatz ist die Applikation von Probiotika. Ausgehend von der Beobachtung, dass eine normale bakterielle Flora eine fehlregulierte Immunreaktion auszulösen scheint, entwickelte man das Konzept, Bakterien wie nichtpathogene *E. coli*, *Lactobacilli* oder *Bifidobacteria*, die keine entzündungsverstärkenden Effekte zu haben scheinen, der Darmflora zuzugeben. Erste Ergebnisse sind vielversprechend. Die diskutierten Wirkmechanismen der Probiotika umfassen eine kompetitive Hemmung der normalen Flora, Immunmodulation, Einfluss der Probiotika auf Epithelzellen und Produktion antimikrobieller Metabolite (Shanahan, 2001).

1.3 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide sind ein zentraler Bestandteil der unspezifischen Abwehr des Menschen. Sie kommen in zahlreichen Organen und Organsystemen vor, zum Beispiel in der Lunge, auf der Haut, auf Epithelien des Auges, des Urogenitaltraktes und des Gastrointestinaltraktes (Fellermann *et al.*, 2001). Die antimikrobiellen Peptide werden entweder in Körperflüssigkeiten wie die Lymphe abgegeben, sie kommen in phagozytosefähigen Zellen vor oder sie werden auf Schleimhautoberflächen freigesetzt (Hecht, 1999).

In der großen und weiterhin wachsenden Gruppe der bekannten antimikrobiellen Peptide, von denen mittlerweile Hunderte in Pflanzen, Insekten und verschiedensten Tieren bis hin zum Menschen entdeckt worden sind, bilden die Defensine eine Familie.

Bei den Defensinen handelt es sich um kationische, argininreiche Moleküle eines Molekulargewichtes von 3-5 kDa, die aus 28-44 Aminosäuren bestehen und eine typische Tertiärstruktur mit drei antiparallelen β -Faltblättern, die durch Schleifen und eine β -Haarnadel verbunden sind, besitzen. Weiterhin kommen in Defensinen immer drei Disulfidbrücken zwischen ihren sechs Cysteinresten vor. Bei α -Defensinen liegen die Disulfidbrücken zwischen Cys 1 und 6, Cys 2 und 5 und Cys 3 und 4, während sie bei β -Defensinen die Aminosäurereste Cys 1 und 5, Cys 2 und 4 und Cys 3 und 6 verbinden. Bisher sind die α -Defensine Humanes Neutrophiles Peptid (HNP) 1-4 und Humanes Defensin (HD) 5-6 beschrieben. Die bekannten β -Defensine heißen Humanes Beta Defensin (HBD) 1-4 (Fellermann *et al.*, 2001, Garcia *et al.*, 2001, Harder *et al.*, 2000, Lehrer und Ganz, 1999). Auf menschlichen Schleimhäuten sind bisher HD 5-6 und HBD 1-3 nachgewiesen worden (Frye *et al.*, 2000, Harder *et al.*, 2001), HNP 1-4 kommen bevorzugt in menschlichen Granulozyten vor, wo sie 10% der gebildeten Proteine ausmachen (Ganz, 1999).

Aufgrund ihrer polaren Molekülstruktur können Defensine in Phospholipidmembranen eindringen und entweder allein oder nach Bildung eines Komplexes Poren bilden. Es wird postuliert, dass der geringere Anteil anionischer Phospholipide in Membranen von Eukaryonten diese vor einer Schädigung durch Defensine schützt (Ganz, 1999).

Die humanen epithelialen α -Defensine HD 5-6 besitzen ein breites bakterizides und fungizides Wirkspektrum (Bevins *et al.*, 1999). So ist für rekombinantes HD 5 eine

Wirkung gegen *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Candida albicans* nachgewiesen (Martin Porter *et al.*, 1997).

HBD 1, das in geringer Menge konstitutiv exprimiert wird (Zhao *et al.*, 1996), wirkt bakterizid gegen Gram-negative Bakterien (Hecht, 1999). Die Bildung von HBD 2 wird durch Bakterien, Hefen und proinflammatorische Zytokine wie TNF α oder IL-1 β induziert. Es wirkt bakterizid gegen Gram-negative Bakterien und *Candida albicans* und bakteriostatisch gegen Gram-positive Bakterien. HBD 3 ist wie HBD 2 induzierbar, es ist allerdings bakterizid gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Außerdem ist es wirksam gegen *Candida albicans* (Harder *et al.*, 2001, Schibli *et al.*, 2002).

HBD 4, für das eine starke antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus carnosus* und *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen wurde, war in vitro durch Gram-positive Bakterien, Gram-negative Bakterien und besonders durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einen Proteinkinase-C-Stimulator, induzierbar, nicht aber durch IL-1 α , IL-6, Interferon γ und TNF α (Garcia *et al.*, 2001).

Die Genloci der humanen Defensine liegen auf Chromosom 8p22-p23.1 (Harder, 1997, Liu, 1997). Für HBD 1 sind Polymorphismen beschrieben, deren Bedeutung allerdings bisher unklar ist.

1.4 Defensinexpression im Kolon bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Im Kontext chronisch entzündlicher Darmerkrankungen interessiert neben den biologischen Funktionen der auf menschlichen Schleimhäuten vorkommenden Defensine vor allem ihr Expressionsmuster im Gastrointestinaltrakt. Erstbeschreiber des Vorkommens von HD 5-6 im Dünndarm waren Jones und Bevins (Jones und Bevins, 1992, 1993). Die Expression der β -Defensine HBD 1-2 wurde zuerst von O'Neil *et al.* (O'Neil *et al.*, 1999) publiziert. Frye *et al.* (Frye *et al.*, 2000) untersuchten die Expression von HD 5-6- und HBD 1-2-mRNA im Gastrointestinaltrakt von Patienten, bei denen eine Darmerkrankung endoskopisch ausgeschlossen wurde. Man stellte eine geringe, aber bei allen Patienten vorhandene Expression von HBD 1-mRNA fest. HBD 2-mRNA war bei keinem der Patienten nachweisbar. Diese Ergebnisse weisen auf eine konstitutive Bildung

von HBD 1 hin, während HBD 2, wie bereits beschrieben, im Rahmen einer Entzündung induziert wird.

Die α -Defensine HD 5-6 wiesen ein uneinheitliches Expressionsmuster auf, das vor dem Hintergrund der Tatsache, dass bislang wenig über die Regulation der α -Defensin-Expression bekannt ist, schwer zu interpretieren ist.

Versuche der eigenen Arbeitsgruppe (Wehkamp *et al.*, 2002) beleuchten die Expression von β -Defensinen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. HBD 1 wurde in allen Patientengruppen vergleichbar häufig nachgewiesen. In der entzündeten Mukosa zeigte sich eine Reduktion. Eine Expression von HBD 2 wurde bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen signifikant häufiger nachgewiesen als bei nicht entzündeten Kontrollen. Interessanterweise gab es hier allerdings auch einen Unterschied zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Bei Patienten mit Colitis ulcerosa war signifikant häufiger HBD 2-mRNA nachweisbar als bei Patienten mit Morbus Crohn. Diese Beobachtung, die nicht durch die medikamentöse Therapie bedingt zu sein scheint, da diese sich nicht erheblich unterscheidet, führte zu der Frage, ob ein Defekt der HBD 2-Regulation, zum Beispiel in der Promotorregion, bei einer der Erkrankungen vorliegt, der diese unterschiedliche mRNA-Expression hervorruft.

Kürzlich wurde beschrieben, dass auch HBD 3 vom Kolonepithel exprimiert wird. Das Expressionsmuster von HBD 3 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gleicht dem von HBD 2, auch HBD 3 war vorwiegend bei Patienten mit Colitis ulcerosa erhöht, nicht aber bei Patienten mit Morbus Crohn (Wehkamp *et al.*, 2003).

1.5 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Promotorregion des HBD 2-Gens von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe analysiert werden. Zu diesem Zweck sollte DNA aus Kolonschleimhautbiopsien extrahiert werden und zunächst die Promotorregion des HBD 2-Gens sequenziert werden. Folgende Patientenkollektive wurden gewählt: eine Gruppe von Patienten mit Colitis ulcerosa, bei denen HBD 2-mRNA nachgewiesen wurde, und je eine

Gruppe von Patienten Morbus Crohn und eine Kontrollgruppe ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen, bei denen keine HBD 2-mRNA nachgewiesen wurde. Die Sequenzen sollten mit einer Referenzsequenz, publiziert von Bevins *et al.* (H. sapiens beta defensin 2 (HBD2) gene, complete cds., GenBank access code AF071216), verglichen werden.

In einem zweiten Versuchsteil sollte die Promotoraktivität des untersuchten DNA-Fragmentes festgestellt werden und mit Aktivitäten kleinerer Teile des Fragmentes verglichen werden, um Rückschlüsse auf die Relevanz möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen ziehen zu können. Weiterhin sollten die Auswirkungen auffälliger, auf eine Patientengruppe beschränkter Sequenzunterschiede auf die Promotoraktivität des untersuchten Fragmentes untersucht werden.

Zusammenfassend lassen sich folgende Fragen formulieren:

- 1) Gibt es in der Promotorregion des HBD 2-Gens bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Sequenzabweichungen gegenüber einer Kontrollgruppe?
- 2) Treten solche Sequenzabweichungen in einer Patientengruppe gehäuft auf und/oder liegen sie in möglichen Transkriptionsfaktorbindungsmotiven?
- 3) Besitzt das analysierte DNA-Fragment Promotoraktivität?
- 4) Besitzen Teilfragmente des analysierten DNA-Fragmentes Promotoraktivität und wie stark ist diese im Vergleich zu der des Gesamtfragmentes?
- 5) Führen Basenveränderungen, die in einer der Patientengruppen gehäuft auftreten, zu einer Veränderung der Aktivität des Promotorfragmentes?

2 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Agarose I	Amresco, USA
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aqua bidest	DeltaSelect, Pfullingen
Bacto [®] Tryptone	Becton Dickinson, USA
Bacto [®] Yeast Extract	DIFCO Laboratories, USA
Bitek Agar	Becton Dickinson, USA
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bromthymolblau	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol p. a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, Stock Solution	Amresco, USA
Foetal Bovine Serum	Gibco, Großbritannien
G418 Sulfate	PAA Laboratories, Österreich
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol p.a.	Merck, Darmstadt
Kanamycin Monosulfate	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid p. a.	Merck, Darmstadt

Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
PBS-DULBECCO (1*) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom KG, Berlin
Penicillin-Streptomycin Solution	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium with L-Glutamine	Gibco, Großbritannien
SDS	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Trypsin 10* Solution	Sigma, Deisenhofen
Tumor Necrosis Factor alpha	Strathmann Biotec AG, Hamburg
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.1.2 Materialien

Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Cuvettes 0,4 cm gap	BIO-RAD, München
Messplatten (Luminometer)	FluoroNunc 96 wells	NUNC, Dänemark
Probenröhrchen	15 ml, 50 ml 1,5 ml Mikroschraubröhren, Biosphere Microtubes 1,5 ml und 2 ml, Multiply-PCR-Gefäße, Multiply-PCR-Ketten	Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	NUNCLON EasyFlask TM , Kulturoberfläche 75cm ² , mit Filter	NUNC, Dänemark
Zellkulturschalen	NUNCLON TM Δ Multischalen 6 wells	NUNC, Dänemark

2.1.3 Kits und Reagentien für die Sequenzierung

Thermosequenase	Amersham, Braunschweig
A, C Mixes	Amersham, Braunschweig
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Chill out wax	Biozym, Hess. Oldendorf
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Rapid gel XL (40%) Gellösung	Amersham, Braunschweig
Sequitherm excel	Biozym, Hess. Oldendorf
SSB	Amersham, Braunschweig
Stop/Loading Puffer	Amersham, Braunschweig
TMAC	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Urea	USB, USA
0,45µm Filter, Milliex-HA	Millipore, Eschborn

2.1.4 Kits

Dual-Luciferase™ Reporter Assay System	Promega, USA
NucleoSpin® Plasmid Mini-Prep-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Prep-A-Gene® DNA Purification Systems	BIO-RAD, München
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Invitrogen, USA

2.1.5 Enzyme

DNA-Polymerasen	Pfu DNA Polymerase Taq DNA Polymerase	Promega, USA
Restriktionsendonukleasen	Aat II Eco O 65 I Hind III Kpn I Stu I Xho I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Amersham, Braunschweig
DNA-Ligase	T4-DNA-Ligase	Roche, Schweiz

2.1.6 Verwendete Zelllinie

HeLa-Zellen	ATCC Nummer: CCL-2
-------------	--------------------

2.2 Verwendete Geräte

Analysenwaage	AK160	Mettler, Giessen
Brutschränke	kelvitron [®] t	Heraeus, Hannover
Elektroporator	Gene Pulser [®] II	BIO-RAD, München
Flachbrett- Gelelektrophorese- Apparatur	The Unbreakable Horizontal Minigel System	Owl Scientific, Inc., USA
Gelschlitten	EASY-CAST [™] Electrophoresis System , Model #B2 und Model #B1A	WTW, Weilheim
Hamilton 8-Kanalpipette		MWG, Ebersberg
Luminometer	Microlumat LB 96 P	EG&G Berthold, Bad Wildbad
Mikroliterpipetten		Roth, Karlsruhe Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Neubauerzählkammer	Assistent	Hecht, Sondheim
pH-Meter	Microprocessor pH Meter pH 196	Beckman, München
Photometer	UV-DU 460 Spectrometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	pipettus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sequenziergerät	DNA Sequencer model 4000L	LI-COR, USA
Spannungsquelle (Gelelektrophorese)	Model 200/2.0 Power Supply	BIO-RAD, München
Thermoblock	TB1 Thermoblock	Biometra, Göttingen

Thermocycler	T Gradient, T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV-Photoanlage	FLX-20M	Vilber Loumat, Frankreich
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger, Freiburg im Breisgau
Vortex	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	1083	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	2 K 15 Biofuge A, Biofuge 22R, Megafuge 1.0R, Minifuge GL	Sigma, Osterode Heraeus, Hannover

2.3 Stammlösungen

LB-Medium	10 g Tryptone + 5 g Yeast extract + 10 g NaCl + Aqua bidest ad 1000 ml; pH 7,0
Schwere Lösung (Probenauftragspuffer)	50% (v/v) Glycerin, 0,2% (w/v) SDS, 0,05% Bromthymolblau, 0,05% Xylencyanol in 1* TAE-Puffer
TAE (50*)	2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA; pH 8,3
TBE (10*)	1340 mM Tris Base, 450 mM Borsäure, 25mM EDTA; pH 8,3-8,7
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Na ₂ , 2*H ₂ O); pH 8,0

3 Methoden

3.1 Vorversuche und Patientenkollektive

Im Rahmen dieser Arbeit wurde DNA aus Kolonschleimhautbiopsien extrahiert, die im Rahmen von Koloskopien gewonnen wurden. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zunächst wurde die RNA isoliert und durch RT-PCR auf das Vorhandensein von HBD 2-mRNA untersucht. Dann wurde die DNA, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, aus den Proben isoliert und weiter verwendet.

Es wurde DNA von 9 Patienten mit Morbus Crohn, 10 Patienten mit Colitis ulcerosa und 10 Kontrollen ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen analysiert.

3.2 Molekularbiologische Basismethoden

Die in diesem Kapitel dargestellten Methoden fanden in Versuchsteil I und Versuchsteil IIa Anwendung. In den einzelnen Kapiteln werden sie nicht mehr näher erläutert.

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation sequenzspezifischer DNA-Fragmente.

Hierbei denaturiert man zunächst die DNA (typischerweise 3-5 min bei 94°C). Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf ca. 50°C abgekühlt. Diese im Einzelfall experimentell zu ermittelnde Temperatur liegt etwa 3°C unter der sogenannten Schmelztemperatur, die nach folgender Formel berechnet wird: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ (A, C, G und T stellen die Anzahl der Basen im Primer dar). Die Schmelztemperatur ist die Temperatur, bei der die Hälfte der Primer an die einzelsträngige DNA binden würden

(„Annealing“). Die Primer sind zwei kurze endständige DNA-Fragmente. Primer I ist komplementär zum Plusstrang des Beginns des zu amplifizierenden Fragmentes, Primer II entspricht dem Ende des Plusstrangs, so dass sie an beiden Enden des interessierenden Fragmentes spezifisch an den jeweils komplementären DNA-Einzelstrang hybridisieren. Nach Erhitzen auf 72°C synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase, ausgehend von dem jeweiligen Primer, in 5'-3'-Richtung einen neuen DNA-Strang, so dass zwei komplette DNA-Doppelstränge resultieren. Anschließend wird die DNA wieder denaturiert, diesmal für 30 s. Der Zyklus von Denaturierung, „Annealing“ und DNA-Synthese wird 25-35 mal wiederholt. Abschließend findet mit dem Ziel, alle Doppelstränge zu vervollständigen, eine 5-10 Minuten dauernde „terminale Elongation“ statt. Die PCR wird in programmierbaren Thermocyclern durchgeführt.

Hitze stabile Taq-Polymerase, ursprünglich aus *Thermophilus aquaticus* isoliert, ist das am häufigsten zur DNA-Synthese bei der PCR eingesetzte Enzym. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Generierung der PCR-Fragmente für die Sequenzierung und die Klonierung der Reportervektoren Pfu-Polymerase (isoliert aus *Pyrococcus furiosus*) verwendet, da diese zusätzlich zur 5'-3'-Polymerisierung von Nukleotiden in Doppelstrang-DNA eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität („proofreading-activity“) besitzt. Dieses Enzym hat eine gegenüber der Taq-Polymerase geringere Fehlerrate und synthetisiert DNA-Doppelstränge mit glatten Enden („blunt-ended“).

Nach der DNA-Extraktion aus Kolonschleimhautbiopsien wurde eine PCR mit Taq-Polymerase durchgeführt. Dabei wurde das GAPDH-Gen amplifiziert. GAPDH ist ein kurzes, mehrfach im menschlichen Genom vorkommendes Gen. Seine Amplifikation mittels PCR ist in vielen Labors etabliert und dient häufig als Positivkontrolle. So diente sie auch hier zum Nachweis genomischer DNA.

Insgesamt wurden sieben verschiedene PCR-Fragmente generiert. Die zu diesem Zweck etablierten Protokolle sind in Abschnitt 3.3.1, 3.3.2 und 3.4.1 zu finden.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Basenfolge der verwendeten Primer

Primer	Basenfolge
HBD2-pro1-fwd	5'-ACG GTG TGA ATG GAA GGA ACT -3'
HBD2-pro1-rev	5'-GAG TGA GGG GCT GGG TCT GTC-3'
HBD2-pro2-fwd	5'-GAA TGT CCG AAC AAT GGA TAG-3'
HBD2-pro2-rev	5'-TGG AGG GGA ATG AGA GGA GAC-3'
HBD2-pro3-fwd	5'-TGA GTC CAG ATT TGC ATA AGA-3'
HBD2-LucAssay-rev	5'-GGC TGA TGG CTG GGA GCT TCA-3'
GAPDH-fwd	5'-TGC CTC CTG CAC CAC CAA CTG-3'
GAPDH-rev	5'-CGC CTG CTT CAC CCC CTT CTT-3'

3.2.2 Gelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von geladenen Teilchen, beispielsweise DNA, im elektrischen Feld abhängig von Gesamtnettoladung, Größe und Gestalt der Moleküle. Als Träger dienten Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 0,5-2% (w/v). Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose zunächst eingewogen, dann in 1*TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und auf ca. 60°C abgekühlt. Anschließend wurde Ethidiumbromid zupipettiert, so dass sich eine Konzentration von 200 µg*ml⁻¹ ergab. Die Gele wurden zum Gelieren in Gelschritten mit einer Taschenschablone gegossen und nach dem Aushärten mit 1*TAE-Puffer übergossen.

Zu präparativen Zwecken wurden die DNA-Proben in einer Konzentration von ca. 0,1 g* l⁻¹ und im Verhältnis 1:10 mit schwerer Lösung gemischt in die Taschen des Gels eingebracht. Bei analytischen Gelen wurde, sofern die DNA-Konzentration bekannt war, entsprechend verfahren, allerdings mit geringeren Stoffmengen (ca.1 µg DNA). Von

PCR-Produkten wurden jeweils 10 µl (im Verhältnis 10:1 mit schwerer Lösung gemischt) untersucht. Nach Mini- und Maxi-Präparation wurden ebenfalls geschätzte Nukleinsäuremengen analysiert.

Nach einer Laufzeit von 45 min bis zu 3 h (in Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Moleküle) bei einer Spannung von 4-6,7 V*cm⁻¹ wurden die Gele unter Durchleuchtung mit UV-Licht photographiert. Um die DNA sichtbar zu machen, nutzt man hierbei die Eigenschaft des Ethidiumbromid, zwischen die Basen der DNA zu interkalieren und nach Anregung durch UV-Licht sichtbare orangefarbene Strahlung zu emittieren.

Die Banden wurden durch Vergleich mit einem Längenstandard identifiziert. Aus präparativen Gelen wurden Streifen, die die interessierenden Banden enthielten, mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Gelstreifen weiterverwendet.

3.2.3 Klonierung von PCR-Produkten

Die mit Pfu-Polymerase generierten PCR-Produkte wurden in *E.coli* kloniert. Zu diesem Zweck wurde das TOPO-Cloning System (Invitrogen) benutzt.

Bei dieser Methode wird zunächst das PCR-Produkt, das „blunt-ends“ besitzen muss, in einen Vektor kloniert. Dieser Vektor ist ein zunächst linearer DNA-Doppelstrang, der die Eigenschaft hat, bei geeigneten Reaktionsbedingungen ein ebenfalls lineares doppelsträngiges DNA-Fragment an einer definierten Stelle einzubauen und sich zum Plasmid, also zu einer ringförmigen Struktur zu schließen. Er besitzt „upstream“ und „downstream“ des eingebauten Fragmentes Primerbindungsmotive für M13-Primer und verschiedene definierte Restriktionsschnittstellen. Weiterhin zeichnet er sich durch zwei Antibiotikaresistenzgene aus.

Zur Durchführung der Klonierung wurden zunächst 1-2 µl PCR-Produkt und 1 µl „Salt Solution“ zu sterilem H₂O gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 5 µl resultierte. Das Gemisch wurde mit Hilfe der Pipette vermischt und nach einer Inkubation von 6-7 min bei Raumtemperatur auf Eis gelagert. Anschließend fand der Transformationsschritt statt.

1-2 µl des Ansatzes wurden zu 50 µl einer Bakteriensuspension mit kompetenten *E. coli*, die in der Lage sind, Plasmide aufzunehmen und zu replizieren, pipettiert. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde der Versuchsansatz einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt (30 s im ruhigen Thermoblock bei 42 °C), so dass die Bakterienzellen Plasmide aufnehmen konnten. Nun wurde der Ansatz nach Zupipettieren von 250 µl SOC-Medium bei 37°C für 1 h mit einer Geschwindigkeit von 450 rpm im Thermoblock geschwenkt. Abschließend wurde die Bakteriensuspension auf einem mit Kanamycin versetzten LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien abgepickt oder, falls wegen zu dichten Wachstums nötig, zuerst Klone mittels Drei-Ösen-Ausstrich vereinzelt und nach einer weiteren Über-Nacht-Kultur abgepickt und weiterverwendet.

3.2.4 DNA-Präparation (Mini-Prep/Maxi-Prep)

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde das NucleoSpin Plasmid MiniKit (Macherey-Nagel) verwendet.

Nach Anleitung wurde eine Kolonie eines Bakteriums in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin oder Kanamycin (Konzentration je 100 µg*ml⁻¹) über Nacht unter starkem Schwenken bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 10 min bei 3509*g abzentrifugiert, in 250 µl Resuspendierungspuffer mit RNase (Puffer I) resuspendiert und mit 250 µl Lysepuffer (Puffer II) versetzt. Während der anschließenden Inkubation (5 min bei Raumtemperatur) wurde das Reaktionsgefäß sechsmal langsam geschwenkt. Das Reaktionsgemisch war nun klar und viskös und die Bakterienbestandteile in Lösung überführt. Nun wurden dem Reaktionsgemisch 300 µl Neutralisationspuffer (Puffer III) zugegeben und erneut durch sechsmaliges langsames Schwenken gemischt. Das Lysat wurde trüb, Zelldebris, genomische DNA, Proteine und Kaliumdodecylsulfat fielen aus und wurden durch Zentrifugation (10 min, 22938*g, 4°C) von der gelösten Plasmid-DNA abgetrennt. Der Überstand wurde nun in ein mit einer Silikamembran ausgestattetes Zentrifugationsröhrchen pipettiert. Bei der folgenden Zentrifugation (1 min, 22938*g, 4°C) band die DNA an die Silika-Matrix. Nachfolgend wurde die Membran durch

Zentrifugation (2 min, 22938*g, 4°C) nach Zugabe von 600 µl Waschpuffer (Puffer IV mit Ethanol) gewaschen. Abschließend wurde das Zentrifugationsröhrchen auf ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 50 µl AE-Puffer auf die Membran gegeben, und nach einer Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur wurde das System wiederum zentrifugiert (1 min, 22938*g, 4°C). Die gereinigte Plasmid-DNA war nun im durchgeflossenen AE-Puffer gelöst.

Die maximalen erreichten DNA-Konzentrationen lagen bei ca. 1000 µg*ml⁻¹. Die Lagerung der Mini-Prep-Produkte erfolgte bei -20°C.

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit gewonnen.

Dazu wurde zunächst als Vorkultur eine Bakterienkolonie in 10 ml LB-Medium, versetzt mit Ampicillin oder Kanamycin (Konzentration je 100 µg*ml⁻¹), angesetzt und ca. 6 h bei 37°C unter starkem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Diese Vorkultur wurde zu 190 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin (Konzentration je 100 µg*ml⁻¹)) gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht unter Schütteln bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Bakterien wurden aus dem gesättigten Medium abzentrifugiert (15 min, 3363*g, 4°C) und in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 langsam gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 wurde das Reaktionsgemisch erneut langsam gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 45 min bei 3363*g und 4°C zentrifugiert. Der die Plasmid-DNA beinhaltende Überstand wurde auf die Silika-Matrix eines zwischenzeitlich mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierten QIAGEN-tip 500-Filterröhrchens pipettiert. Nach Durchfluss der Flüssigkeit und Binden der Plasmid-DNA wurde der Silika-Filter zweimal mit jeweils 30 ml QC-Puffer gewaschen. Es wurden 15 ml QF-Puffer auf den Filter gegeben und der Durchfluss in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Diese DNA-Lösung wurde mit 10,5 ml Isopropanol versetzt, geschüttelt und 45 min bei 3363*g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 5 ml eiskaltem 75%igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (30 min, 3363*g, 4°C). Nun wurde der Überstand dekantiert und das Pellet 15-20 min an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl TE-Puffer (pH 8) gelöst und bei -20°C gelagert. Die maximal erreichten DNA-Konzentrationen lagen bei ca. 8000 µg*ml⁻¹.

3.3 Versuchsteil I: PCR, Klonierung und Sequenzierung

In Versuchsteil I wurden ausgehend von genomischer DNA aus Kolonschleimhautbiopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Kontrollen mittels PCR zwei überlappende DNA-Fragmente generiert, um eine insgesamt 937 Basenpaare umfassende Region zu analysieren, die das Startcodon des HBD 2-Gens und davor liegende eventuelle Transkriptionsfaktorbindungsmotive beinhaltet.

Die PCR-Produkte wurden in *E. coli* kloniert und anschließend sequenziert.

3.3.1 Isolation von Nukleinsäuren

Kolonschleimhautbiopsien (50-100 mg Gewebe) wurden mit 1 ml TRIzol versetzt, homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200 µl Chloroform zupipettiert. Das Gemisch wurde geschüttelt und für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation für 15 min mit 12000*g bei 4°C bildete sich ein farbloser Überstand und eine rote untere Phase. Der die RNA enthaltende Überstand wurde in ein anderes Röhrchen überführt, die RNA wurde isoliert und analysiert.

Die die DNA enthaltende untere Phase wurde zunächst bei -70°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden 300 µl Ethanol (abs.) zugegeben. Nach Mischen erfolgte eine Inkubation für 2-3 min bei Raumtemperatur. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min, 2000*g, 4°C) wurde die den Überstand bildende Phenol-/Ethanol-Phase verworfen.

Das Pellet wurde mit 1 ml 0,1 M Na-Citrat in 10%igem Ethanol während einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter permanentem Schwenken gewaschen und durch erneute Zentrifugation (5 min, 2000*g, 4°C) wieder von der flüssigen Phase abgetrennt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Waschschrift einmal wiederholt. Nun wurden 1,5 ml 75%iger Ethanol zupipettiert, und es folgte eine 10-20minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter häufigem Schwenken. Nach der darauf folgenden Zentrifugation (5 min, 2000*g, 4°C) wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet für 15 min luftgetrocknet. Abschließend wurde es in 100 µl 8 mM

Natronlauge und 6,6 µl 0,1 M HEPES unter Erwärmen auf 60°C (10 min im Wasserbad) gelöst. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Die gelöste DNA wurde bei -20°C gelagert. Ein DNA-Nachweis erfolgte durch Amplifikation des GAPDH-Gens mittels PCR, das Protokoll dieser PCR ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: PCR-Protokoll für das GAPDH-Gen

Reaktionsbedingungen	PCR-Produkt GAPDH	Reaktionsbedingungen	PCR-Produkt GAPDH
Reaktionsvolumen	50 µl	Touch down	nein
Template	5 µl	Initiale Denaturierung	94°C, 5 min
Primer I	GAPDH-fwd 200 nM	Denaturierung	94°C, 30 s
Primer II	GAPDH-rev 200 nM	Annealing	60°C, 30 s
dNTP	200 µM	Elongation	72°C, 1 min
Taq-Polymerase	1,25 U	Zyklen	35
Hot start	ja	Terminale Elongation	72°C, 7 min

3.3.2 Generierung der Matrizen für die Sequenzierung

Nach Generierung der PCR-Fragmente HBD 2-Pro1 und HBD 2-Pro2, ausgehend von genomischer DNA, wurden diese in nach der in 3.2.3 beschriebenen Methode mit Hilfe des TOPO-Cloning Systems in *E. coli* kloniert. Die Plasmide wurden durch Mini-Prep amplifiziert und isoliert. Sie dienten als Matrize für die Sequenzierung. Die PCR-Protokolle sind in Tabelle 3 dargestellt. Das Fragment HBD 2-ProG wurde ebenfalls in *E. coli* kloniert und diente nach Sequenzierung als Matrize für die PCR zur Generierung der Promotorfragmente für den Einbau in die Reportervektoren (siehe 3.4).

Tabelle 3: PCR-Protokolle für die Fragmente HBD 2-Pro1, -Pro2 und -ProG

Reaktionsbedingungen	HBD 2-Pro1	HBD 2-Pro2	HBD 2-ProG
Reaktionsvolumen	50 µl	50 µl	50 µl
Template	5 µl	5 µl	5 µl
Primer I	HBD2-pro1-fwd 400 nM	HBD2-pro2-fwd 600 nM	HBD2-pro1-fwd 200 nM
Primer II	HBD2-pro1-rev 400 nM	HBD2-pro2-rev 600 nM	HBD2-pro2-rev 200 nM
dNTP	200 µM	200 µM	200 µM
Pfu-Polymerase	1,25 U	1,25 U	1,25 U
Hot start	ja	ja	ja
Touch down	nein	nein	nein
Initiale Denaturierung	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Denaturierung	94°C, 30 s	94°C, 30 s	94°C, 30 s
Annealing	58,4°C, 30 s	50°C, 30 s	50°C, 30 s
Elongation	72°C, 1,5 min	72°C, 1,5 min	72°C, 1,5min
Zyklen	35	35	35
Terminale Elongation	72°C, 7 min	72°C, 7 min	72°C, 7 min

3.3.3 Zyklus-Sequenzierung (thermal cycle sequencing)

Die DNA-Sequenzierung wurde in Anlehnung an die Methode von Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977), die auch als Didesoxynukleotid- oder Kettenabbruchverfahren bezeichnet wird, durchgeführt. Erstbeschreiber der Zyklus-Sequenzierung sind Sears *et al.* (Sears *et al.*, 1992) und Slatko (Slatko, 1994).

Zunächst wurde ein Mastermix (13 µl Gesamtvolumen), bestehend aus 1 µg Plasmid-DNA (Mini-Prep-Produkt) in wässriger Lösung oder AE-Puffer, M13-Sequenzierprimer in einer Konzentration von 20 mmol·l⁻¹ (universal oder reverse) und 0,5 µl DMSO-Stammlösung hergestellt und durch kurzes Anzentrifugieren vermischt. Parallel wurde auf dem Boden von vier Mikroreaktionsgefäßen je 1 µl ddA-, ddC-, ddG- oder ddT-Terminationsmix (Amersham) pipettiert. Dazu wurden je 2,9 µl des Mastermix pipettiert. Abschließend wurde der Reaktionsansatz mit einem Tropfen „Chill out wax“ überschichtet. Es wurde eine PCR nach dem in Tabelle 4 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Eine solche PCR unterscheidet sich von der in 3.2.1 erläuterten Methode in zwei entscheidenden Punkten. Erstens wird nur ein Primer benutzt, so dass die synthetisierten DNA-Stränge selbst nicht als Ausgang einer Doppelstrangsynthese dienen. Alle Produkte sind vom Primer ausgehend in 5'-3'-Richtung verlängerte Einzelstränge. Zweitens bricht nach zufälligem Einbau eines ddNTP in einen solchen Einzelstrang die Synthese ab, so dass das Reaktionsprodukt aus einem Gemisch unterschiedlich langer Einzelstränge besteht, die in einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden können.

Die Sequenziergele wurden nach Anleitung (MWG-BIOTECH EUROPE) hergestellt (Rapid Gel XL (Amersham), 41 cm). Zur genauen Zusammensetzung der Gele sei auf das Handbuch verwiesen. Die Gele wurden nach Reinigung der die Gelkammer bildenden Glasplatten mit Ethanol und Zusammensetzen des „gel sandwich“ in dieses eingegossen und mit einer Taschenschablone versehen. Sie härteten zwei Stunden in horizontaler Lage aus, wurden in den „dNA sequencer“ (LI-COR) eingesetzt und mit „Long Run Buffer“ (10*TBE) übergossen. Nach Einpipettieren der Produkte der Zyklus-PCR in die Taschen des Gels wurde eine Spannung von 1500 V bei einer Leistung von 40 W und einer Stromstärke von 35 mA angelegt. Bei einer Temperatur von 45°C liefen die Gele über Nacht.

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte zunächst automatisiert mit Hilfe des „QuickSequenceIR“-Programms (MWG-BIOTECH EUROPE).

Tabelle 4: Protokoll der Zyklus-PCR

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
95°C	165 s	
95°C	15 s	11
55°C	15 s	
70°C	15 s	
95°C	20 s	12
54°C	20 s	
70°C	20 s	
95°C	40 s	
4°C	Pause	

3.3.4 Auswertung der Ergebnisse

Die Gele mit den DNA-Banden wurden photographiert und durch das Computerprogramm Image Analysis 4.0 ausgewertet. Dabei wird die Intensität der Fluoreszenz der Banden verglichen und so die Basenfolge ermittelt. Diese Ergebnisse wurden in einem Modus des Computerprogramms, in dem die Intensität der Fluoreszenz als Peak dargestellt wird, wobei jeder Base eine andere Farbe zugeordnet ist, überprüft und korrigiert. Anschließend wurden die Ergebnisse der Sequenzierung beider Einzelstränge desselben DNA-Fragmentes miteinander verglichen. Falls keine Übereinstimmung der Basenfolge bestand, wurden beide Einzelstränge erneut sequenziert.

3.4 Versuchsteil IIa: Generierung von Reporterplasmiden

3.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Produkte HBD 2-Luc1, HBD 2-Luc2 und HBD 2-Luc3 wurden nach den in Tabelle 5 dargestellten Protokollen generiert. Als Matrizen dienten dabei die linearen DNA-Doppelstränge 41 Pro1, 41 Pro2 und 41 ProG, die zuvor nach Sequenzierung per Restriktionsverdau aus den entsprechenden rekombinierten TOPO-Vektoren geschnitten und nach präparativer Gelelektrophorese aus einem Agarosegel eluiert worden waren.

Tabelle 5: PCR-Protokolle für die Fragmente HBD 2-Luc1, -Luc2 und -Luc3

Reaktions- bedingungen	HBD 2-Luc1	HBD 2-Luc2	HBD 2-Luc3
Reaktions- volumen	50 µl	50 µl	50 µl
Template	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Primer I	HBD2-pro1- fwd 1 µM	HBD2-pro2- fwd 1 µM	HBD2-pro3- fwd 1 µM
Primer II	HBD2- LucAssay-rev 1 µM	HBD2- LucAssay-rev 1 µM	HBD2- LucAssay-rev 1 µM
dNTP	200 µM	200 µM	200 µM
Pfu- Polymerase	1,25 U	1,25 U	1,25 U
Hot start	ja	ja	ja
Touch down	nein	nein	nein
Initiale Denaturierung	94°C, 5 min	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Denaturierung	94°C, 45 s	94°C, 45 s	94°C, 45 s
Annealing	60,7°C, 45 s	57,1°C, 45 s	62,4°C, 45 s
Elongation	72°C, 1,5 min	72°C, 1,5 min	72°C, 1,5 min
Zyklen	35	35	35
Terminale Elongation	72°C, 7 min	72°C, 7 min	72°C, 7 min

3.4.2 Klonierung von PCR-Produkten

Es wurden nach der in 3.2.3 beschriebenen Methode rekombinante TOPO-Vektoren mit den PCR-Produkten 41 Luc1, 41 Luc2 und 41 Luc3 erzeugt.

3.4.3 Restriktionsverdauungen

Eine Restriktionsendonuklease ist ein bakterielles Enzym, das in der Lage ist, doppelsträngige DNA an einem spezifischen Sequenzmotiv zu zerschneiden.

Es wurden überwiegend Restriktionsendonukleasen der Firma Amersham verwendet. Sowohl die Auswahl des Puffers als auch Zeit und Temperatur zur Denaturierung der Enzyme richteten sich nach den im Handbuch gegebenen Empfehlungen. Bei Simultanverdau mit Enzymen der Firma Amersham und mit AatII, bezogen von MBI-Fermentas, wurde der Puffer Y⁺/TANGO (MBI-Fermentas) benutzt.

Zu analytischen Zwecken wurde je 1 µg Plasmid-DNA mit 2 U Restriktionsendonuklease (bei Simultanverdau 2 U pro Enzym) in einem Volumen von 10 µl Puffer für 3-5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend das Enzym durch Erhitzen denaturiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze entweder bei -20°C gelagert oder durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

Für präparative Verdauungen wurde mit 10fachem Ansatz entsprechend verfahren.

3.4.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das Prep-A-Gene DNA Purification System der Firma BIO-RAD verwendet.

Zunächst wurde eine DNA-Bande enthaltender Gelstreifen gleichmäßig auf mehrere 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt. Der DNA-Gehalt der Gelstücke wurde ausgehend von der im präparativen Gel eingesetzten DNA-Menge errechnet, die Gelmasse wurde gewogen.

Pro Gramm Gel wurden der Probe 3 ml Binding-Puffer zugegeben, die Probe wurde nach Schütteln für 10-15 min bei 53°C inkubiert. Dann wurden pro µg DNA 5 µl Prep-A-Gene-Matrix zugefügt und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 1 min bei 22938*g zentrifugiert und der Überstand verworfen. In den folgenden Schritten wurde das 25fache Volumen des eingesetzten Volumens Prep-A-Gene-Matrix verwendet. Zunächst wurden die Pellets in Binding-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden zentrifugiert (1 min, 22938*g, Raumtemperatur) und der Überstand abgegossen. Nun folgten zwei Waschschriffe mit nach Anleitung frisch angesetztem Waschpuffer. Zwischen und nach diesen Waschschriffen wurde zentrifugiert (1 min, 22938*g, Raumtemperatur) und der Überstand dekantiert. Schließlich wurde das Pellet in 20-50 µl Resuspensionspuffer suspendiert. Es folgte eine Inkubation (5 min, 42°C) und abschließende Zentrifugation (1 min, 22938*g, Raumtemperatur). Der die DNA enthaltende Überstand wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.4.5 Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA wurde T4-DNA-Ligase der Firma Roche verwandt. Es wurden DNA-Fragmente mit durch Restriktionsverdauung erzeugten, zueinander passenden Enden in 1*T4-DNA-Ligase-Puffer gelöst. Das Endvolumen lag bei 10 µl, die Stoffmengen betruen 40 fmol für das in den Vektor zu ligierende Fragment und 20 fmol für den aufgeschnittenen Vektor. Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase 18 h bei 4°C im Thermocycler inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde bei -20°C gelagert.

3.4.6 Rekombination von Reportervektoren

Reportervektoren wurden folgendermaßen generiert: aus der vor dem Firefly-Luciferase-Gen des pGL3Basic-Vektors liegenden „multiple-cloning-site“ wurde mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen ein Fragment herausgeschnitten. HBD 2-Promotorfragmente wurden mit Hilfe derselben Restriktionsendonukleasen aus TOPO-Plasmiden herausgeschnitten, in die sie zuvor einkloniert worden waren. Die Enzyme wurden so ausgewählt, dass der Einbau der Promotorfragmente in das Reporterplasmid in der erwünschten Richtung stattfinden konnte. Aufgeschnittenes Reporterplasmid und Promotorfragment wurden ligiert, das generierte Plasmid in kompetenten *E. coli* kloniert und durch Mini-Prep amplifiziert. Der korrekte Einbau der Promotorfragmente wurde durch Restriktionsverdauung bestätigt.

Zur Generierung des Reportervektors Luc1mut wurde zunächst mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen ein Fragment, das Position 2257 enthielt, aus dem Vektor Luc1 herausgeschnitten. Ein entsprechendes Fragment mit der Mutation an Position 2257 wurde aus einem sequenzierten TOPO-Plasmid herausgeschnitten und mit dem aufgeschnittenen Reportervektor ligiert. Der korrekte Einbau des Fragmentes wurde durch Restriktionsverdauung bestätigt.

3.5 Versuchsteil IIb: Reporteragenassay

Zur Bestimmung der Aktivität von Promotorfragmenten wurden Dual-Luciferase-Assays durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den in Versuchsteil IIa generierten Reporterplasmiden und pRL-TK2 Plasmiden in einem festen Verhältnis kotransfiziert. Das auf dem pGL3-Vektor liegende Luciferasegen kodiert für die Firefly-Luciferase, ein Enzym, das einen Fluoreszenzfarbstoff umsetzt. Nach Zugabe von Luciferase-Assay-Reagent II zum Lysat der transfizierten Zellen misst man zunächst die Fluoreszenz, die Ausdruck der Firefly-Luciferaseaktivität ist. Dann wird die Reaktion der Firefly-Luciferase durch Zugabe von Stop-And-Glow-Puffer abgebrochen. Dieser Puffer enthält das Substrat der Renilla-Luciferase, die vom pRL-TK2 Plasmid kodiert wird. Die Promotoraktivität der einklonierten Fragmente wurde bestimmt, indem die Firefly-Luciferaseaktivität auf die Renilla-Luciferaseaktivität, als internem Standard, bezogen wurde.

Einen Tag nach der Transfektion wurde den Zellen ein Selektivmedium mit G418 angeboten, um den transfizierten Zellen einen Selektionsvorteil zu verschaffen. Um proinflammatorische Transkriptionsfaktoren in den transfizierten HeLa-Zellen zu induzieren, wurden die Zellen sieben Stunden vor dem Dual-Luciferase-Assay mit TNF α stimuliert.

3.5.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in 50 ml-Kulturflaschen gezogen. Das Wachstum der Zellen wurde täglich überprüft, alle 2-3 Tage wurde das Kulturmedium abgesogen, die adhären Zellen wurden mit warmem PBS gewaschen, und in jede Flasche wurden ca. 20 ml frisches Kulturmedium gegeben. Wenn die Zellen am Boden einer Flasche konfluent waren, wurde das Medium entfernt, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und dann mit 2-3 ml Trypsinlösung überschichtet. Die Kulturflasche wurde leicht geschwenkt und in den Brutschrank gestellt, bis die Zellen sich vom Boden der Flasche gelöst hatten oder sich durch Schwenken der Flasche lösen ließen. Dann wurde warmes Zellkulturmedium in die Flasche gegeben. Die Zellsuspension wurde auf neue Kulturflaschen verteilt, die mit

frischem Medium auf ca. 20 ml pro Flasche aufgefüllt wurden. Die Zellkulturen wurden bei 37°C inkubiert.

3.5.2 Elektroporation

Zur Transfektion der HeLa-Zellen wurden Elektroporationen durchgeführt.

Die Zellen wurden trypsinisiert (siehe 3.5.1) und in Zellkulturmedium (ohne FCS und Antibiotika) suspendiert. Die Zellzahl in der Suspension wurde nach Zählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer errechnet.

Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 700*g, Raumtemperatur), die Zellen mit eiskaltem Zellkulturmedium (ohne FCS und Antibiotika) gewaschen, und nach erneuter Zentrifugation (5 min, 700*g, Raumtemperatur) und Abgießen des Überstandes wurde eine Suspension mit einer Zellzahl zwischen $2 \cdot 10^6$ und 10^7 in 350 µl Zellkulturmedium (ohne FCS und Antibiotika) erzeugt. Diese Zellsuspension wurde mit einer Lösung von 50 µg Reporterplasmid mit Firefly-Luciferase und 5 µg PRL-TK2-Plasmid (mit Renilla-Luciferase) in 50 µl TE-Puffer (pH 8) in einer Elektroporationsküvette durch einmaliges Aufsaugen mit der Pipette vermischt. Die Küvette wurde 5 min auf Eis inkubiert. Bei einer Spannung von 250 V und einem Stromfluss von 950 µF erfolgte nun die Elektroporation. Anschließend wurden die Zellen mit ca. 12 ml warmem Medium mit FCS und Antibiotika, das danach gleichmäßig auf eine 6-well-Kulturplatte verteilt wurde, aus der Küvette ausgespült.

Die 6-well-Kulturplatten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesogen, die adhären Zellen wurden mit warmem PBS gewaschen, und es wurden 2 ml Zellkulturmedium FCS, Antibiotika und G418 in jede Schale der 6-well-Kulturplatte gegeben. Die Zellkulturen wurden wieder über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.5.3 Stimulation der HeLa-Zellen mit TNF α

Die transfizierten HeLa-Zellen wurden durch Zugabe von TNF α in einer Konzentration von 10 ng*ml⁻¹ Zellkulturmedium mit FCS, Antibiotika und G418 stimuliert. Die Stimulation erfolgte immer zwei Tage nach der Elektroporation, einen Tag nach erstmaliger Zugabe des Selektionsmediums mit G418 und sieben Stunden vor Durchführung des Dual-Luciferase-Assays.

3.5.4 Dual-Luciferase-Assay

Dual-Luciferase-Assays wurden mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) durchgeführt.

Nachdem die Zellen mit warmem PBS gewaschen worden waren, wurden ihnen pro Schale der 6-well-Kulturplatte 200 μ l Passive-Lysis-Puffer zugegeben. Die Kulturplatte wurde 15 min bei Raumtemperatur auf dem Rüttler leicht geschwenkt.

In die Schalen einer 96-well Messplatte für das Luminometer wurden 10 μ l nach Anleitung hergestelltes Luciferase-Assay-Reagent II vorgelegt. Dabei wurde in alle Richtungen mindestens eine Schale freigelassen, um Überstrahlungsartefakte bei den Messungen zu vermeiden. Die Lumineszenz wurde gemessen und später als Hintergrund von den anderen Messwerten abgezogen. Dann wurden 20 μ l Zelllysate zupipettiert und die Lichtemission, die proportional zur Menge der gebildeten Firefly-Luciferase war, gemessen. Nun wurden 10 μ l frisch zubereiteter Stop-And-Glow-Puffer in die Reaktionsgefäße gegeben und die Lichtemission, die nun proportional zur Menge der gebildeten Renilla-Luciferase war, gemessen.

Alle Messungen dauerten 10 s. Um Messfehler durch in das Luminometer eindringendes Licht auszuschließen, wurde die Umgebung des Gerätes abgedunkelt.

3.5.5 Auswertung der Ergebnisse

Die Ermittlung der Werte für die Aktivität der Reportergene erfolgte nach folgender Formel:

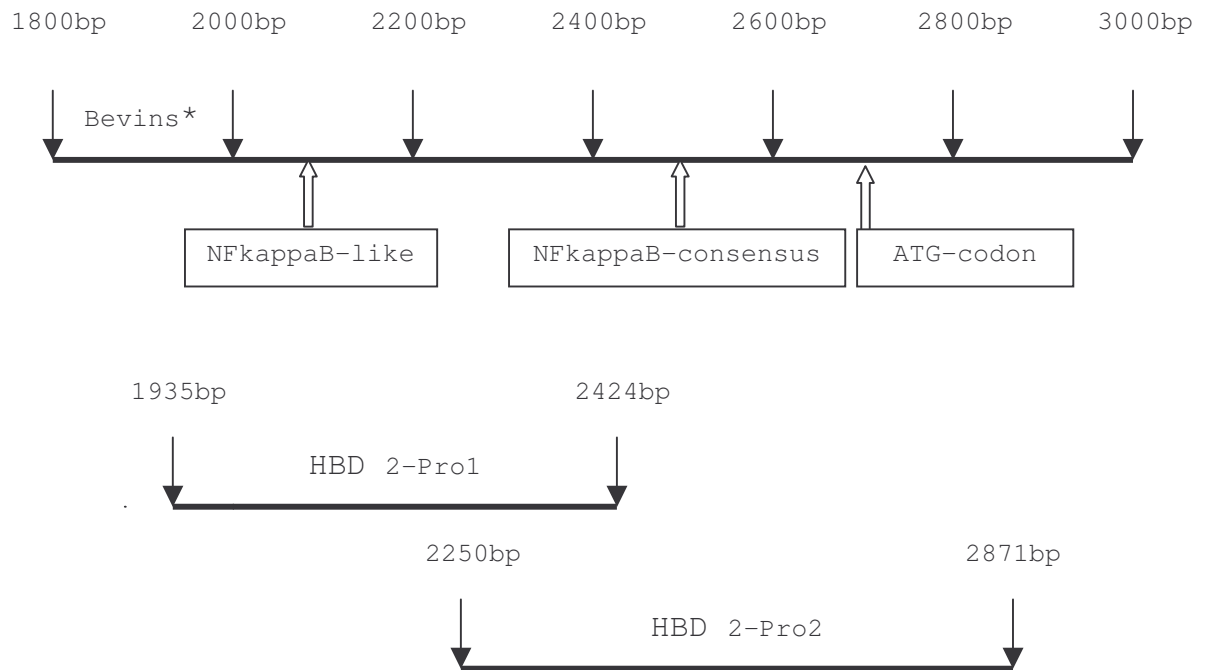
$$\frac{[\text{Messwert (Firefly)} - \text{Messwert (Hintergrund)}]}{[\text{Messwert (Renilla)} - \text{Messwert (Hintergrund)}]} \sim \text{Reportergenaktivität}$$

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Sequenzierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Fragmente von 29 Patienten analysiert. Es handelte sich um 9 Patienten mit Morbus Crohn und 10 Kontrollpatienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung, in deren Kolonschleimhaut keine HBD 2-mRNA nachgewiesen worden war, und 10 Patienten mit Colitis ulcerosa, bei denen HBD 2-mRNA in Kolonschleimhautbiopsien nachweisbar war. Die Kontrollpatienten hatten zum Teil keine Entzündung des Kolon und zum Teil eine unspezifische Dickdarmentzündung, beispielsweise eine Divertikulitis. Von den Patienten wurden die überlappenden DNA-Fragmente HBD 2-Pro1 und HBD 2-Pro2 nach PCR und Klonierung in *E. coli* sequenziert. Die sequenzierten Fragmente sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Bei zwei Patienten mit Colitis ulcerosa gelang nur die Sequenzierung des Fragmentes HBD 2-Pro2 (Patienten 34 und 93).

Abbildung 1: Schematische Darstellung der sequenzierten Promotorfragmente



*Reference: Bevins et al., *H. sapiens* beta defensin 2 (HBD2) gene, complete cds., GenBank access code AF 071216

Die im Folgenden beschriebenen Unterschiede zur Vergleichssequenz nach Bevins sind in Abbildung 2 dargestellt.

- Zwischen Position 2205 und 2206 wurde bei 24 von 27 sequenzierten Proben die Insertion eines Cytosin nachgewiesen.
- An Position 2257 ist bei drei von acht Patienten mit Colitis ulcerosa das in der Vergleichssequenz vorliegende Cytosin durch ein Adenin ersetzt.
- An Position 2260 liegt nur bei einem Patienten mit Colitis ulcerosa wie in der Vergleichssequenz ein Adenin, bei allen anderen Patienten liegt dort ein Guanin.
- An Position 2463 gibt es einen Austausch eines Guanin durch ein Cytosin bei drei Patienten. Dieser Austausch ist nicht auf eine Patientengruppe beschränkt, tritt allerdings nicht bei Kontrollen auf.
- An Position 2624 liegt bei zehn von 29 Patienten ein Cytosin anstelle eines Thymin.
- An Position 2773 gibt es bei einem Kontrollpatienten und einem Patienten mit Morbus Crohn einen Austausch eines Cytosin durch ein Thymin.

Neben den in Abbildung 2 dargestellten Abweichungen von der Vergleichssequenz fand sich an Position 1964 eine Deletion in zwei Proben. Außerdem fanden sich, vor allem am Beginn der analysierten Region, einige Punktmutationen, die nur einmal im untersuchten Kollektiv auftraten.

Im Anhang sind die gesamten Ergebnisse der Sequenzierung dargestellt.

 -..... 2205 2255 2265
Bevins	CCTCC-AGGG	AATGTCCGAA	CAATGGATAG
5pro1CU	CCTCC C AGGG	AATGT C AGAG	CAATGGATAG
19pro1CU	CCTCC C AGGG	AATGT C AGAG	CAATGGATAG
24pro1CU	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
35pro1CU	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
52pro1CU	CCTCC-AGGG	AATGTCCGAA	CAATGGATAG
83pro1CU	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
94pro1CU	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
107pro1CU	CCTCC C AGGG	AATGT C AGAG	CAATGGATAG
22pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
28pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
38pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
53pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
79pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
84pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
85pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
99pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
110pro1MC	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
8pro1K	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
9pro1K	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
10pro1K	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
20pro1K	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
41pro1K	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
59pro1K	CCTCC-AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
29pro1KE	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
51pro1KE	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
69pro1KE	CCTCC C AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG
100pro1KE	CCTCC-AGGG	AATGT C CGAG	CAATGGATAG

 2465 2625 2775
Bevins	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
5pro2CU	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
19pro2CU	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
24pro2CU	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
34pro2CU	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
35pro2CU	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
52pro2CU	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
83pro2CU	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
93pro2CU	AGCAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
94pro2CU	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
107pro2CU	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
22pro2MC	AGCAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
28pro2MC	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
38pro2MC	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
53pro2MC	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
79pro2MC	AGCAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
84pro2MC	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
85pro2MC	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
99pro2MC	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
110pro2MC	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
8pro2K	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
9pro2K	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
10pro2K	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
20pro2K	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC
41pro2K	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
59pro2K	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
29pro2KE	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
51pro2KE	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
69pro2KE	AGGAATTTTC	CAATACCAGT	TTCTGATGC
100pro2KE	AGGAATTTTC	CAACACCAGT	TTCTGATGC

Abbildung 2: Auffällige Basenabweichungen in der Sequenzierung

A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; Bevins: Vergleichssequenz nach Bevins *et al.*;

pro1: HBD 2-Pro1;

pro2: HBD 2-Pro2;

CU: Colitis ulcerosa;

MC: Morbus Crohn;

K: Kontrolle;

KE: Kontrolle, entzündet.

Anmerkung:

Die Nummerierung der Positionen richtet sich nach der Vergleichssequenz.

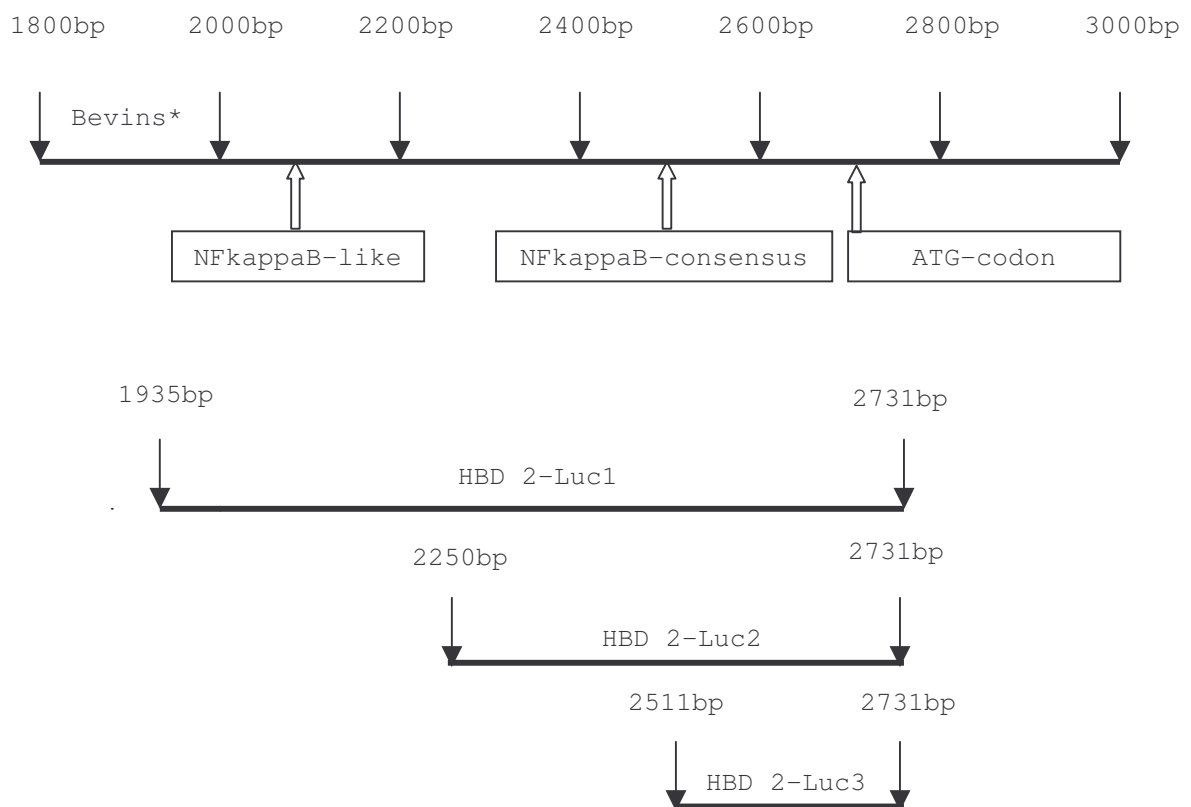
Die Proben sind nach Entnahme chronologisch mit Nummern bezeichnet worden, diese Benennung wurde beibehalten.

4.2 Reportergenassay

4.2.1 Analyse der Aktivität des unmutierten Promotorfragmentes

Die Promotorfragmente, deren Aktivität mittels Dual-Luciferase-Assay ermittelt wurde, sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der untersuchten Promotorfragmente



*Reference: Bevins et al., H. sapiens beta defensin 2 (HBD2) gene, complete cds., GenBank access code AF 071216

Die Sequenz der Promotorfragmente unterschied sich von der Vergleichsequenz durch Insertion eines Cytosin zwischen Position 2205 und 2206.

Es wurden drei Versuche unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass durch Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ ein möglichst deutlicher Effekt auf die Promotoraktivität und damit auf die Luminiszenz des umgesetzten Luciferins erreicht wurde. Als Positivkontrolle diente der pGL3-Control-Vektor, der SV40-Promotor- und SV40-Enhancer-Elemente besitzt und sich durch eine starke Luciferaseexpression auszeichnet, die in HeLa-Zellen ohne Stimulation stattfindet. Der pGL3-Basic-Vektor, der weder Promotor- noch Enhancer-Elemente aufweist, diente als Negativkontrolle. In Abbildung 4 sind die Ergebnisse eines dieser Versuche (Versuch 3) schematisch dargestellt. Entsprechende Abbildungen für die Versuche 1 und 2 finden sich im Anhang.

Versuch 3

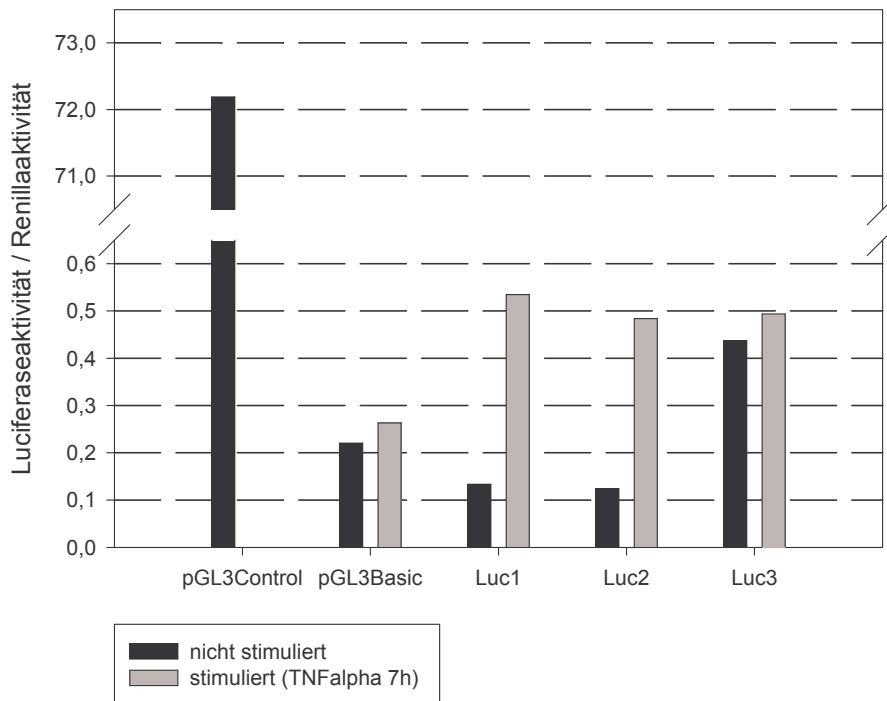


Abbildung 4: Ergebnis eines Dual-Luciferase-Assays (Versuch 3) mit unmutierten Promotorfragmenten

pGL3Control: pGL3-Control-Plasmid; pGL3Basic: pGL3-Basic-Plasmid; Luc1: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc1; Luc2: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc2; Luc3: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc3.

4.2.2 Analyse der Aktivität eines Promotorfragmentes mit einem Basenaustausch an Position 2257

Es wurden drei Dual-Luciferase-Assays durchgeführt, in denen die Promotoraktivität des nicht mutierten Gesamtfragmentes (Luc1) der eines Fragmentes gegenübergestellt wurde, das sich an Position 2257 durch eine Punktmutation (Adenin statt Cytosin) vom Gesamtfragment unterschied (Luc1mut). Bei diesen Versuchen wurde der pGL3-Control-Vektor als Positivkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse eines dieser Versuche (Versuch 6) sind in Abbildung 5 dargestellt. Im Anhang sind Abbildungen der Ergebnisse der Versuche 4 und 5 zu finden.

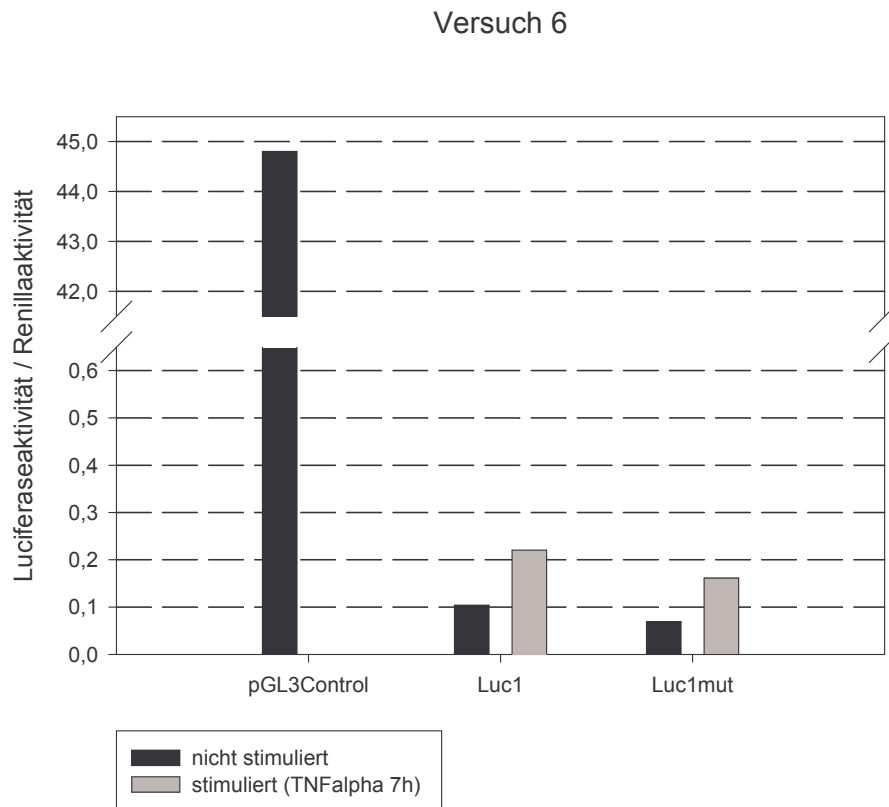


Abbildung 5: Ergebnis eines Dual-Luciferase-Assays (Versuch 6) mit mutiertem Promotorfragment

pGL3Control: pGL3-Control-Plasmid; Luc1: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc1; Luc1mut: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc1mut.

4.2.3 Zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse der Dual-Luciferase-Assays

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse aller durchgeführten Dual-Luciferase-Assays zusammenfassend dargestellt.

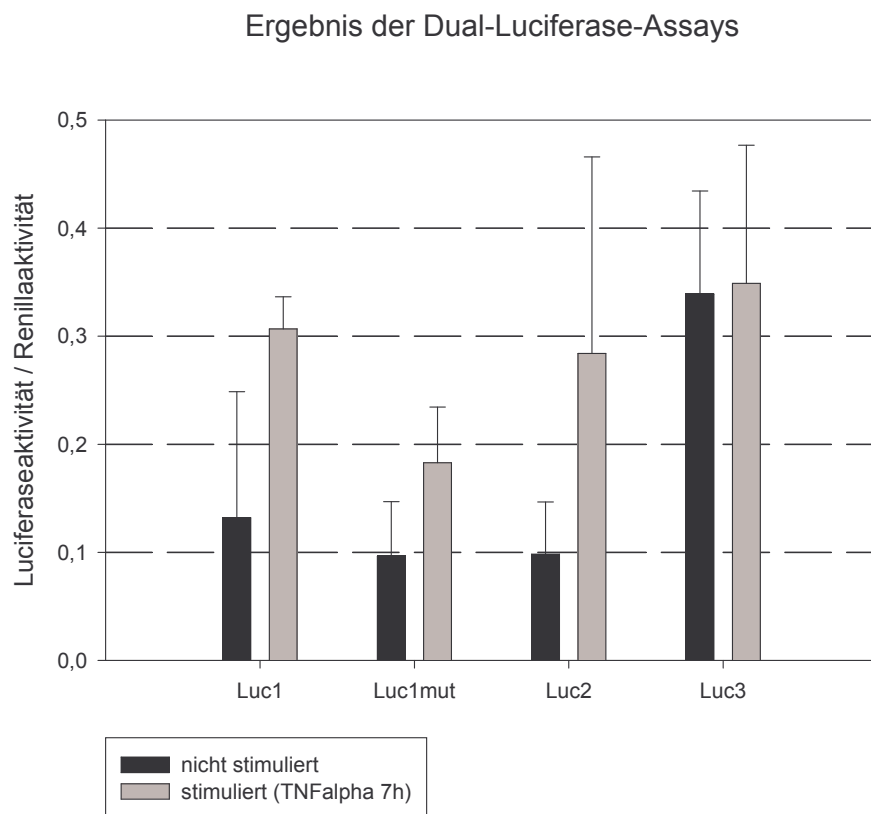


Abbildung 6: Ergebnis der Dual-Luciferase-Assays

Luc1: Reportervektor mit inkloniertem Fragment HBD 2-Luc1; Luc1mut: Reportervektor mit inkloniertem Fragment HBD 2-Luc1mut; Luc2: Reportervektor mit inkloniertem Fragment HBD 2-Luc2; Luc3: Reportervektor mit inkloniertem Fragment HBD 2-Luc3.

Anmerkung:

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung mit n=3 für Luc1mut, Luc2 und Luc3 und mit n=6 für Luc1.

4.2.4 Darstellung der Relation der Aktivität stimulierter Zellen zu der nicht stimulierten Zellen

In Abbildung 7 ist das Verhältnis der relativen Luciferaseaktivität (bezogen auf die Renillaaktivität) der stimulierten Zellen zur relativen Luciferaseaktivität der nicht stimulierten Zellen dargestellt.

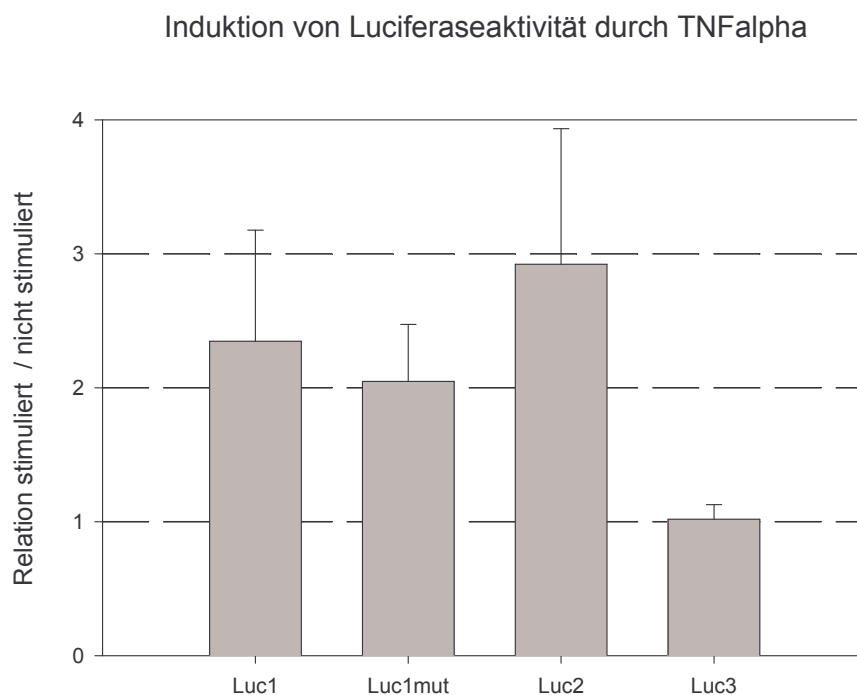


Abbildung 7: Induktion von Luciferaseaktivität durch TNFalpha

Luc1: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc1; Luc1mut: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc1mut; Luc2: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc2; Luc3: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc3.

Anmerkung:

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung mit n=3 für Luc1mut, Luc2 und Luc3 und mit n=6 für Luc1.

5 Diskussion

Vor dem Hintergrund der nachgewiesenermaßen wichtigen Rolle von genetischen Faktoren in der Ätiopathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und der Entschlüsselung des menschlichen Genoms arbeiten derzeit zahlreiche Arbeitsgruppen an der Identifikation und Charakterisierung von Gendefekten, die zur Entstehung eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa beitragen. Beim Morbus Crohn, für den eine stärkere genetische Prädisposition vorliegt, hat man durch Kopplungsanalysen eine Reihe von Genen eingegrenzt, in denen ein Defekt zu einer erhöhten Empfänglichkeit für die Erkrankung führen könnte (Ahmad *et al.*, 2001). Diese Gene nennt man „susceptibility genes“. Allerdings handelt es sich um so viele Gene, dass eine einfache Mutationssuche in einem größeren Kollektiv sehr aufwändig wäre. Ein Gen konnte allerdings bereits identifiziert werden (Hugot *et al.*, 2001, Ogura *et al.*, 2001) und wird für ca. 15% des genetischen Risikos bei Morbus Crohn verantwortlich gemacht. Das Genprodukt NOD2/CARD15 vermittelt die intrazelluläre Erkennung bakterieller Zellwandbestandteile. Seine Fehlfunktion hat eine verminderte oder ausbleibende Antwort auf eine bakterielle Invasion zur Folge. Dies belegt einen in zahlreichen klinischen Beobachtungen vermuteten Barriedefekt der Schleimhaut bei Morbus Crohn.

Versuche der eigenen Arbeitsgruppe haben ergeben, dass Patienten mit Morbus Crohn signifikant seltener HBD 2-mRNA in entzündeter Kolonschleimhaut exprimieren als Patienten mit Colitis ulcerosa (Wehkamp *et al.* 2002, 2003). Das HBD 2-Gen liegt auf Chromosom 8p22-p23.1 (Harder *et al.*, 1997), also nicht in einer der bisher beschriebenen Kopplungszonen, dennoch könnte eine verminderte Induktion von HBD 2 im Rahmen eines Morbus Crohn eine Rolle spielen. Das HBD 2-Gen könnte somit als funktionelles „susceptibility gene“ bezeichnet werden. Ein Mangel an HBD 2 könnte dazu führen, dass Bakterien und andere Pathogene leichter an den Epithelzellen adhäreren und diese letztlich invadieren. Die Folge wäre eine Aktivierung spezifischer Immunzellen und die Auslösung beziehungsweise Perpetuierung einer Entzündung.

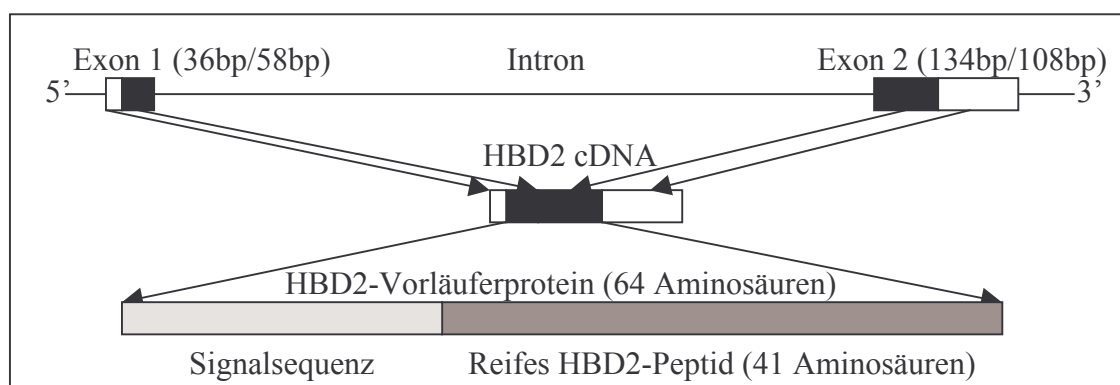
Andererseits wäre auch denkbar, dass eine dauerhafte Expression von HBD 2 bei Patienten mit Colitis ulcerosa die Entzündungsreaktion unterstützt und so eine schädigende Wirkung entfaltet. Ein zytotoxischer Effekt von Defensinen konnte nachgewiesen werden (Lehrer *et al.*, 1993).

Diese hypothetischen pathologischen Mechanismen könnten in beiden Fällen zu einer Entgleisung der Immunreaktion im Rahmen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung beitragen. Die Frage, warum die Expression von HBD 2 sich bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unterscheidet, ist offen und verdient vor dem Hintergrund der weitgehend ungeklärten Ätiopathogenese dieser Krankheiten nähere Betrachtung.

5.1 Struktur des HBD 2-Gens und Erläuterung der Ergebnisse der Sequenzierung

Das HBD 2-Gen, Chromosomenposition 8p22-23.1 (Harder *et al.*, 1997), besteht aus zwei Exons und einem Intron. Harder *et al.* gehen vom in Abbildung 8 gezeigten Aufbau aus (Harder *et al.*, 2000), während Liu *et al.* 81 Basenpaare für das erste Exon, 1610 Basenpaare für das Intron und 238 Basenpaare für das zweite Exon beschreiben (Liu *et al.*, 1998).

Abbildung 8: HBD 2-Genstruktur nach Harder (Harder *et al.*, 2000)



In der Promotorregion, die sich „upstream“ des ersten Exon befindet, liegen eine TATA-Box (ab Position 2667 nach Bevins *et al.*), eine CAAT-Box (ab Position 2621 nach Bevins *et al.*) und eine Reihe möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Harder *et al.*, 2000).

Einer der Patienten mit Morbus Crohn weist unmittelbar vor der TATA-Box die Insertion eines Thymin auf (siehe 79pro2MC zwischen 2667 und 2668 (Anhang 1)).

In der beschriebenen CAAT-Box weisen 10 von 29 Patienten anstelle des Thymin ein Cytosin auf (Position 2624). Es handelt sich dabei um drei Patienten mit Colitis ulcerosa, zwei Patienten mit Morbus Crohn und fünf Kontrollpatienten. Die Relevanz der CAAT-Box ist bisher nicht untersucht und funktionelle Auswirkungen des Polymorphismus scheinen aufgrund seiner scheinbar zufälligen Verteilung auf die einzelnen Patientengruppen keinen Einfluß auf die HBD 2-Expression zu nehmen.

Der Basenaustausch bei einem Patienten mit Colitis ulcerosa und einem Patienten mit Morbus Crohn an Position 2463 liegt in einer möglichen NSF1/2-Bindungsstelle.

Die anderen Unterschiede zur Referenzsequenz nach Bevins liegen nicht in Consensusmotiven für humane Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Interessant scheint dennoch der Basenaustausch an Position 2257, der ausschließlich bei Patienten mit Colitis ulcerosa auftritt. In enger Nachbarschaft (Position 2260) befindet sich ein weiterer Basenaustausch bei einem Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu allen anderen sequenzierten Proben, allerdings in Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz. Zusammenfassend zeigte die Promotorsequenzierung eines limitierten Patientenkollektives, selektiert anhand der mukosalen HBD 2-Expression, keine Abweichungen von der Vergleichssequenz in putativen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Einzig auffällig war eine Häufung einer Mutation an Position 2257 bei Patienten mit Colitis ulcerosa, welches zum Anlass genommen wurde, funktionelle Auswirkungen dieser Mutation mittels Reporterassays zu untersuchen.

An Position 2773 kommt ein Austausch von Cytosin durch Thymin bei einem Kontrollpatienten und einem Patienten mit Morbus Crohn vor. Dieser Basenaustausch liegt bereits im HBD 2-Gen und führt zu einer Änderung der Aminosäurefolge (TCC kodiert Serin, TTC kodiert Phenylalanin).

5.2 Nuclear Factor kappa B (NFκB)

Nuclear Factor kappa B (NFκB) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Bildung zahlreicher Zytokine, Enzyme, Zelladhäsionsmoleküle und antimikrobieller Peptide (Baldwin, Jr., 2001, Zhang und Gosh, 2001) im Rahmen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort reguliert. Er gehört zur Rel-Familie der Transkriptionsfaktoren, deren Mitglieder eine hochgradig homologe Region von ca. 300 Aminosäuren besitzen, die für Bildung von Dimeren, DNA-Bindung, Lokalisation im Zellkern und Bindung an IκB verantwortlich ist (Bäurle und Henkel, 1994). Als IκB bezeichnet man eine Gruppe von Proteinen, die im Zytoplasma an NFκB gebunden sind, und, vermittelt durch extrazelluläre Stimuli wie proinflammatorische Zytokine, Bakterien und ihre Toxine, Viren, Oxidantien oder LPS, durch den „IκB kinase komplex“ (IKK) phosphoryliert werden. Daraufhin wird IκB von NFκB abgespalten und im Gefolge degradiert. NFκB wird in den Zellkern transloziert, kann an spezifische Sequenzmotive der DNA binden und die Gentranskription regulieren (Schottelius und Baldwin, 1999). In der Aktivierung von NFκB spielen membranständige „toll-like“-Rezeptoren (TLR) eine zentrale Rolle, die nach Aktivierung eine Kaskade intrazellulärer Reaktionen anstoßen, die schließlich zur Phosphorylierung von IκB führen. Wie dabei die verschiedenen bisher bekannten „toll-like“-Rezeptoren zusammenarbeiten oder sich unterscheiden, ist noch unbekannt (Zhang und Gosh, 2001). Man weiß allerdings, dass der CD14-Rezeptor als Korezeptor für TLR4 bei einer Aktivierung durch LPS erforderlich ist (Becker *et al.*, 2000). Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch Bakterien und ihre Bestandteile, proinflammatorische Zytokine, T- und B-Zell-Mitogene und physikalischen und chemischen Stress (Zhang und Gosh, 2001). Teilweise geschieht dies über Regelkreise. So induziert NFκB die Bildung von Zytokinen wie TNFα und IL-1, die ihrerseits zu einer Aktivierung von NFκB führen (Schottelius und Baldwin, 1999).

NFκB liegt als Dimer der Untereinheiten NFκB1 (p50/p105), NFκB2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB und c-Rel vor (Baldwin, Jr., 2001, Tak und Firestein, 2001, Zhang und Gosh, 2001). Das Heterodimer p50/p65 ist das an häufigsten vorkommende NFκB-Dimer (Baldwin, Jr., 2001, Tak und Firestein, 2001). p65 besitzt eine „*trans*-activating“ Region, die die Transkription induziert. p50 und p52 weisen keine solche „*trans*-activating“ Region auf und unterdrücken die Expression der durch sie regulierten Gene (Schottelius und Baldwin, 1999, Zhang und Gosh, 2001). Bei Patienten mit chronisch entzündlichen

Darmerkrankungen scheinen p50/p65-Heterodimere zu überwiegen, während bei gesunden Kontrollen p50-Homodimere überwiegen (Neurath *et al.*, 1998). Die verschiedenen NFκB-Dimere konkurrieren im Zellkern um die vorhandenen Bindungsstellen und folglich ist das Überwiegen von Heterodimeren, die p65 enthalten, eine mögliche Ursache für eine Überexpression von Entzündungsproteinen (Schottelius und Baldwin, 1999).

NFκB ist nur ein Faktor unter vielen in der Modulation der Entzündungsreaktion. So benötigen zum Beispiel Chondrozyten zur maximalen Expression von Kollagenase-3 neben NFκB auch den Transkriptionsfaktor AP-1 (Baldwin, Jr., 2001).

Das Vorkommen von NFκB in Kolonepithelzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist mehrfach nachgewiesen (Neurath *et al.*, 1996, 1997, Rogler *et al.*, 1998). Schreiber *et al.* beschreiben ein Überwiegen von p50/p65-Heterodimeren in Lamina propria-Biopsien bei Patienten mit Morbus Crohn gegenüber Patienten mit Colitis ulcerosa und Kontrollen (Schreiber *et al.*, 1998), was eher eine verstärkte Expression NFκB-regulierter Proteine bei Patienten mit Morbus Crohn nahe legt. Dies steht im Widerspruch zu den eigenen Vorarbeiten bei Patienten mit Morbus Crohn, bei denen HBD 2 seltener exprimiert wird.

5.3 Genregulation des HBD 2

Die Konsensussequenz für das NFκB-Bindungsmotiv lautet 5'-GGGRNNWYCC-3' (Wada *et al.*, 2001) (A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; R: A oder G; N: A,C,G oder T; W: A oder T; Y: C oder T), und das im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierte DNA-Fragment enthält eine Region, die mit dieser Sequenz bis auf eine Base übereinstimmt (Position 2502-2510: 5'-GGGGTTTCC-3').

O'Neil *et al.* wiesen nach, dass HBD 2 ein NFκB-Zielgen ist. In ihren Versuchen mit Caco-2- und MG-132-Zellen (beides Kolonepithelzelllinien) führte die Stimulation der Zellen mit IL-1α zu einer Expression von HBD 2, die Infektion der Zellen mit einem Virus, das einen IκB-Superrepressor exprimiert, blockierte die durch IL-1α induzierte HBD 2-Expression. Interessanterweise zeigte sich in den Versuchen aber auch, dass eine Aktivierung von NFκB allein nicht ausreicht, um eine HBD 2-Expression zu induzieren.

So führte eine Stimulation der Zellen mit *E. coli* O29, *Salmonella dublin* und IL-1 α zu einer HBD 2-Expression, während eine Stimulation mit TNF α keine HBD 2-Expression zur Folge hatte (O'Neil *et al.*, 1999). Dieser Unterschied zwischen IL-1 α und TNF α konnte von anderen Arbeitsgruppen allerdings nicht bestätigt werden (Harder *et al.*, 2000). *E. coli*, *Salmonella dublin*, IL-1 α und TNF α sind gleichermaßen starke Aktivatoren von NF κ B (O'Neil *et al.*, 1999). Neuere Experimente von O'Neil *et al.* mit der AGS-Zelllinie (human gastric adenocarcinoma) zeigen neben der starken Induktion von HBD 2 durch IL-1 α auch eine geringe Induktion durch TNF α (O'Neil *et al.*, 2000).

Neben den Experimenten zur Induktion des HBD 2 in Zelllinien gastrointestinalen Ursprungs gibt es auch Ergebnisse in anderen Organen (Bals *et al.*, 1998) und aus ihnen stammenden Zelllinien. In Zellkulturen aus Epithelien des Tracheobronchialsystems zeigte sich eine Expression von HBD 2 nach Stimulation mit IL-1 β . In vivo wurde HBD 2 nur bei Patienten mit bronchopulmonaler Entzündung nachgewiesen, bei Patienten ohne Lungenentzündung war hingegen kein HBD 2 nachweisbar (Singh *et al.*, 1998).

Diamond *et al.* untersuchten die Regulation von „tracheal antimicrobial peptide“ (TAP) in einer bovinen Trachealepithelzelllinie (TEC). TAP ist ein Analogon zu HBD 2, dessen Gen einen ähnlichen Promotor wie HBD 2 mit NF κ B- und NF-IL6-Bindungsstelle aufweist und durch IL-1 β , TNF α und LPS induziert werden kann. In Reporterassays wurde festgestellt, dass sowohl die NF κ B-, als auch die NF-IL6-Bindungsstelle in der Promotorregion für die Expression von TAP erforderlich sind. Während die NF κ B-Aktivität durch LPS induziert wurde, war NF-IL6-Aktivität konstitutiv vorhanden. „Mobility shift assays“ zeigten, dass vor allem p50/p65-Heterodimere mit der NF κ B-Bindungsstelle interagierten (Diamond *et al.*, 2000).

Wada und Mitarbeiter haben festgestellt, dass NF κ B an das oben beschriebene Bindungsmotiv in der HBD 2-Promotorregion bindet und so eine Expression von HBD 2 induziert. Im Rahmen ihrer Versuche wurden MKN45-Zellen, eine humane Magenkrebs-Zelllinie, mit verschiedenen Reporterkonstrukten aus pGL3-Vektor und HBD 2-Promotorfragmenten (nach GenBank AF071216) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit *Helicobacter pylori* infiziert. Die relative Luciferaseaktivität nach Infektion, bezogen auf einen internen Standard wie in der vorliegenden Arbeit, verdoppelte sich bei den Zellen, die ein Reporterplasmid mit dem beschriebenen NF κ B-Bindungsmotiv trugen. Zellen, die ein Plasmid mit einer Mutation in diesem Motiv trugen, zeigten ebenso keine

stärkere HBD 2-Induktion nach Infektion mit *Helicobacter pylori* wie Zellen mit einem Plasmid, das nur die Basen zwischen dem NFκB-Bindungsmotiv und dem Startcodon trug (Wada *et al.*, 2001). Diese Resultate stehen in Übereinstimmung zu den selbst erhobenen Ergebnissen in HeLa-Zellen. Auch hier wurde eine Steigerung der relativen Luciferaseaktivität um den Faktor zwei bis drei nach Stimulation ermittelt. Dabei wurden die Zellen allerdings mit TNFα stimuliert, und im Unterschied zu den Versuchen von O'Neil *et al.* in Kolonepithelzellen (O'Neil *et al.*, 1999) wurde der HBD 2-Promotor aktiviert.

Ogushi *et al.* beschreiben eine Steigerung der relativen Luciferaseaktivität um den Faktor acht bis zehn in Caco-2-Zellen nach Stimulation mit „Flagella filament protein“ (FliC). Die Zellen waren zuvor mit Reporterplasmiden mit der beschriebenen NFκB-Bindungsstelle transfiziert worden. FliC ist das bedeutendste Strukturprotein der Geißel von *Salmonella enteritidis* (Ogushi *et al.*, 2001), das auch die Bildung von TNFα und IL-1β in humanen Monozyten induziert (Ciacci-Woolwine *et al.*, 1998, 1999). Somit ist ein bakterielles Protein als direkter Induktor von HBD 2 nachgewiesen. In beiden Publikationen beschreiben Wada und Ogushi, dass, im Unterschied zu den Ergebnissen von Diamond *et al.* (Diamond *et al.*, 2000) im Tiermodell, in humanen Kolonepithelzelllinien überwiegend NFκB-p65-Homodimere an das NFκB-Bindungsmotiv binden. Außerdem ist die vor der NFκB-Bindungsstelle liegende NF-IL6-Bindungsstelle in den HBD 2-Reporterkonstrukten nicht erforderlich, um die transfizierten Zellen zu einer Luciferaseexpression zu stimulieren. Die eigenen Experimente zeigen keine Mutationen in der aktiven NFκB-Bindungsstelle. Der seltenere Nachweis von HBD 2-mRNA ist also nicht darauf zurückzuführen, dass die HBD 2-Expression durch NFκB nicht induziert werden kann.

Auch in den eigenen Experimenten führte die Stimulation von transfizierten Zellen, die Vektoren mit dem Promotorfragment ohne NFκB-Bindungsstelle tragen, nicht zur Steigerung der HBD 2-Expression, aber im Unterschied zu den Ergebnissen von Wada und Ogushi war die relative Luciferaseaktivität sowohl der unstimulierten, als auch der stimulierten Zellen ungefähr genauso hoch wie die relativen Luciferaseaktivitäten der stimulierten Zellen, die Vektoren mit NFκB-Bindungsstelle trugen. Dies ist unerwartet, da sowohl die Negativkontrolle ohne Promotorfragment als auch Promotorvektor Luc3 keine NFκB-Bindungsstelle aufweisen. Erklärbar ist diese Beobachtung, da Promotorvektor

Luc3 eine TATA-Box enthält. Diese ermöglicht das Andocken der RNA-Polymerase und damit die Transkription unabhängig von NFκB. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer NFκB-Bindungsstelle im Promotor wird die Transkription in Abhängigkeit von der NFκB-Konzentration und der Zusammensetzung des NFκB aus seinen Untereinheiten hoch- oder herunterreguliert.

6 Zusammenfassung

HBD 2 gehört zu den antimikrobiellen Peptiden und ist ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Abwehr auf Epithelien. Die unterschiedlich häufige HBD 2-Expression im Kolon von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa führte zu der Frage, ob ein Sequenzunterschied in der Promotorregion des HBD 2-Gens bei einer der Patientengruppen vorliegt, der diese Beobachtung erklären kann. Zu diesem Zweck wurde DNA von 9 Patienten mit Morbus Crohn, 10 Patienten mit Colitis ulcerosa und 10 Kontrollen untersucht. Bei den Patienten mit Morbus Crohn war zuvor, im Gegensatz zu den Patienten mit Colitis ulcerosa und den Kontrollen, keine HBD 2-mRNA in Kolonschleimhautbiopsien nachgewiesen worden.

Bei der zunächst durchgeführten Sequenzierung des DNA-Abschnittes, der „upstream“ des HBD 2-Gens liegt, fanden sich neben anscheinend zufällig verteilten Punktmutationen eine Insertion eines Cytosin (zwischen Position 2205 und 2206) bei der großen Mehrheit der untersuchten Proben. Weiterhin fanden sich an drei Stellen Basenabweichungen, die bei mehreren Patienten auftraten. Diese Unterschiede zur Vergleichssequenz waren nicht auf eine der Patientengruppen beschränkt. Auf die Gruppe der Patienten mit Colitis ulcerosa waren zwei Sequenzabweichungen, die in enger Nachbarschaft liegen, begrenzt, so dass sich in dieser Region bei der Hälfte der Patienten mit Colitis ulcerosa die Basenfolge von den anderen Patientengruppen unterschied.

Mit Hilfe von Dual-Luciferase-Assays wurde die Promotoraktivität des untersuchten DNA-Fragmentes analysiert. Zu diesem Zweck wurde die Aktivität des Gesamtfragmentes mit der Aktivität von Teilfragmenten verglichen. In den Versuchen zeigte sich, dass die Stimulation der mit Reporterplasmiden transfizierten HeLa-Zellen mit TNF α zu einer Erhöhung der Luciferaseexpression im Vergleich zum nicht stimulierten Versuchsansatz führte, wenn das NF κ B-Bindungsmotiv, das an Position 2502-2510 der Vergleichssequenz liegt, im Promotorfragment vorlag.

Promotorfragmente, die den nur bei Patienten mit Colitis ulcerosa vorkommenden Basenunterschied (Position 2257) zum Gesamtfragment aufwiesen, zeigten in den durchgeführten Versuchen keine sich vom unmutierten Gesamtfragment unterscheidenden Eigenschaften.

Die im Mittelwert höchste Luciferaseexpression, sowohl nach Stimulation mit TNF α , als auch unstimuliert, zeigte sich in Versuchen mit Reportervektoren, die ein DNA-Fragment ohne NF κ B-Bindungsmotiv als Promotor enthielten (Fragment Luc3), das aber die TATA-Box enthielt.

Aus den gewonnenen Daten werden folgende Schlussfolgerungen gezogen:

- 1) Im untersuchten DNA-Fragment gibt es eine Reihe von Punktmutationen.
An drei Stellen treten Basenveränderungen auf, die mehrfach vorkommen und nicht auf eine Patientengruppe beschränkt sind. Sie werden als Polymorphismen interpretiert.
- 2) Zwischen Position 2257 und 2260 treten bei vier von acht Patienten mit Colitis ulcerosa Basenunterschiede auf. Bei anderen Patienten gibt es dort keine Sequenzunterschiede.
- 3) Das analysierte DNA-Fragment besitzt Promotoraktivität.
- 4) Die Promotoraktivität des Gesamtfragmentes und des Fragmentes HBD 2-Luc2 konnten in Versuchen durch Stimulation der mit Reporterplasmiden transfizierten Zellen mit TNF α gesteigert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das in diesen Fragmenten enthaltene NF κ B-Bindungsmotiv auch die HBD 2-Expression in vivo reguliert. Das Fragment HBD 2-Luc3 war zwar nicht stimulierbar, zeigte aber die höchste Spontanaktivität. Dies wird vor dem Hintergrund, dass über NF κ B-Bindungsmotive die Genexpression auch herunterreguliert werden kann, als Ausdruck der Wichtigkeit der TATA-Box für die Initiation der Genexpression interpretiert.
- 5) Die in 2) beschriebenen Basenunterschiede der Patienten mit Colitis ulcerosa führten in Dual-Luciferase-Assays zu keiner sich von der des unmutierten Gesamtfragmentes unterscheidenden Promotoraktivität, so dass auch hier von einem Polymorphismus ausgegangen wird. In welchem Verhältnis das Auftreten des Polymorphismus und die Empfänglichkeit für eine Colitis ulcerosa zueinander stehen, kann aufgrund der dafür zu kleinen Studiengruppen nicht abschließend beurteilt werden.

7 Literaturverzeichnis

- **Ahmad, T., J. Satsangi, D. McGovern, M. Bunce, and D. J. Jewell.** Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 15: 731-748, 2001.
- **Baeurle, P.A., and T. Henkel.** Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179, 1994.
- **Baldwin, Jr., A.S.** The transcription factor NF-κB and human disease. *J Clin Invest* 107:3-6, 2001.
- **Bals, R., X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, and J.M. Wilson.** Human β-Defensin 2 Is a Salt-sensitive Peptide Antibiotic Expressed in Human Lung. *J Clin Invest* 102:874-880, 1998.
- **Becker M.N., G. Diamond, M.W. Verghese, and S.H. Randell.** CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 275:29731-29736, 2000.
- **Bevins, C.L., E. Martin-Porter, and T. Ganz.** Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut* 45:911-915, 1999.
- **Binion, D.G., G.A. West, E.E. Volk, J.A. Drazba, N.P. Ziats, R.E. Petras, and C. Fiocchi.** Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease. *Lancet* 352(9142):1742-1746, 1998.
- **Binion, D.G., G.A. West, K. Ina, N.P. Ziats, S.N. Emancipator, and C. Fiocchi.** Enhanced Leucocyte Binding by Intestinal Microvascular Endothelial Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 112:1895-1907, 1997.
- **Blaser, M.J., R.A. Miller, J. Lacher, and J.W. Singleton.** Patients With Active Crohn's Disease Have Elevated serum Antibodies to Antigens of Seven Enteric Bacterial Pathogens. *Gastroenterology* 87:888-894, 1984.
- **Blumberg R.S., and W. Strober.** Prospects for Research in Inflammatory Bowel Disease. *JAMA* 285:643-647, 2001.
- **Brüning, A., und E.F. Stange.** Krankheitsbild. In: Stange E.F., S. Berndt, H.P. Bruch, A. Brüning, W.E. Fleig, H. Schimmelpenning, J. Schölmerich, und S. Schreiber. *Colitis ulcerosa – Morbus Crohn. UNI-MED Verlag, 1. Auflage: 33-49, Bremen, 1999.*

- **Carter M.J., and A.J. Lobo.** Genes, bacteria and inflammatory bowel disease. *Colorctal Disease* 3:2-6, 2001.
- **Ciacci-Woolwine, F., I.C. Blumfield, S.H. Richardson, and S.B. Mizel.** Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. *Infect Immun* 66:127-1134, 1998.
- **Ciacci-Woolwine, F., P.F. McDermott, and S.B. Mizel.** Induction of cytokine synthesis by flagella from gram-negative bacteria may be dependent on the activation or differentiation state of human monocytes. *Infect Immun* 67:5176-5185, 1999.
- **D’Haens, G., K. Geboes, M. Peeters, F. Baert, F. Penninckx, and P. Rutgeerts.** Early Lesions of recurrent Crohn’s Disease Caused by Infusion of Intestinal Contents in Excluded Ileum. *Gastroenterology* 114:262-267, 1998.
- **Diamond, G., V. Kaiser, J. Rhodes, J.P. Russell, and C.L. Bevins.** Transcriptional Regulation of β -Defensin Gene Expression in Tracheal Epithelial Cells. *Infect Immun* 68:113-119, 2000.
- **Farrell, R.J., and M.A. Peppercorn.** Ulcerative colitis. *Lancet* 359(9303): 331-340, 2002.
- **Fellermann, K., and E.F. Stange.** Defensins – innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:771-776, 2001.
- **Fiocchi, C.** Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205, 1998.
- **Fleig, W.E.** Diagnostik. In: Stange E.F., S. Berndt, H.P. Bruch, A. Brüning, W.E. Fleig, H. Schimmelpenning, J. Schölmerich, und S. Schreiber. Colitis ulcerosa – Morbus Crohn. *UNI-MED Verlag*, 1. Auflage: 52-69, Bremen, 1999.
- **Frye, M., J. Bargon, B. Lembke, T.O.F. Wagner, and R. Gropp.** Differential expression of human α - and β -defensins mRNA in gastrointestinal epithelia. *Eur J Clin Invest* 30:695-701, 2000.
- **Ganz, T.** Defensins and Host Defence. *Science* 286:420-421, 1999.
- **Garcia, J.R., A.Krause, S. Schulz, F.J. Rodriguez-Jimenez, E. Kluver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R. Bals, and W.G. Forssmann.** Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 15:1819-21, 2001.

- **Hampe, J., A. Cuthbert, P.J. Croucher, M.M. Mirza, S. Mascheretti, S. Fisher, H. Frenzel, K. King, A. Hasselmeyer, A.J. MacPherson, S. Bridger, S. van Deventer, A. Forbes, S. Nikolaus, J.E. Lennard-Jones, U.R. Foelsch, M. Krawczak, C. Lewis, S. Schreiber, and C.G. Mathew.** Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357(9272):1925-1928, 2001.
- **Hampe, J., H. Frenzel, M.M. Mirza, P.J. Croucher, A. Cuthbert, S. Mascheretti, K. Huse, M. Platzer, S. Bridger, B. Meyer, P. Nürnberg, P. Stokkers, M. Krawczak, C.G. Mathew, M. Curran, and S. Schreiber.** Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:321-326, 2002.
- **Harder J., U. Meyer-Hoffert, L.M. Teran, L. Schwichtenberg, J. Bartels, S. Maune, and J.M. Schröder.** Mucoid *pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but Not IL-6, Induce Human β -Defensin-2 in Respiratory Epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:714-721, 2000.
- **Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J.M. Schröder.** Isolation and characterisation of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707-5713, 2001.
- **Harder, J., R. Siebert, Y. Zhang, P. Matthiesen, E. Christophers, B. Schlegelberger, and J.M. Schröder.** Mapping of the Gene Encoding Human β -Defensin-2 (DEFB2) to Chromosome Region 8p22-p23.1. *Genomics* 46:472-475, 1997.
- **Hecht, G.** Innate mechanisms of epithelial host defence: spotlight on intestine. *Am J Physiol* 277:C351-C358, 1999.
- **Hollander, D., C.M. Vadheim, E. Brettholz, G.M. Petersen, T. Delahunty, and J.I. Rotter.** Increased Intestinal Permeability in Patients with Crohn's Disease and Their Relatives. *Ann Intern Med* 105:883-885, 1986.
- **Hugot, J.P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.P. Cézard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C.A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas.** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603, 2001.

- **Jones, D.E. and C.L. Bevins.** Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* 315:187-92, 1992.
- **Jones, D.E. and C.L. Bevins.** Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267:23216-25, 1992.
- **Lehrer, R.I., A.K. Lichtenstein, and T. Ganz.** Defensins: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells. *Annu Rev Immunol* 11:105-128, 1993.
- **Lehrer, R.I., and T. Ganz.** Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 11:23-27, 1999.
- **Liu, L., C. Zhao, H.H.Q. Heng, and T. Ganz.** The Human β -Defensin-1 and α -Defensins are Encoded by Adjacent Genes: Two Peptide families with Differing Disulfide Topology Share a Common Ancestry. *Genomics* 43:316-320, 1997.
- **Liu, L., L. Wang, H.P. Jia, C. Zhao, H.H.Q. Heng, B.C. Schutte, P.B. McCray, Jr., and T. Ganz.** Structure and mapping of the human β -defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 222:237-244, 1998.
- **Martin-Porter, E., E. van Dam, E.V. Valore, and T. Ganz.** Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Human Intestinal Defensin 5. *Infect Immun* 65:2396-2401, 1997.
- **Neurath, M.F., and S. Pettersson.** Predominant Role of NF- κ B in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation. *Immunobiol* 198:91-98, 1997.
- **Neurath, M.F., I. Fuss, G. Schürmann, S. Pettersson, K. Arnold, H. Müller-Lobeck, W. Strober, C. Herfarth, and K.H. Meyer zum Büschenfelde.** Cytokine Gene Transkription By NF- κ B Family Members in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Ann N Y Acad Sci* 859:149-159, 1998.
- **Neurath, M.F., S. Pettersson, K.H. Meyer zum Büschenfelde, and W. Strober.** Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p 65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 2:998-1004, 1996.
- **O'Neil D.A., E.M. Porter, D. Elewaut, G.M. Anderson, L. Eckmann, T. Ganz, and M.F. Kagnoff.** Expression and Regulation of the Human β -Defensins hBD-1 and hBD-2 in Intestinal Epithelium. *J Immunol* 163:6718-6724, 1999.

- **O’Neil D.A., S.P. Cole, E. Martin-Porter, M.P. Housley, L.Liu, T. Ganz, and M.F. Kagnoff.** Regulation of human β -Defensins by Gastric Epithelial Cells in Response to Infection with *Helicobacter pylori* or Stimulation with Interleukin-1. *Infect Immun* 68:5412-5415, 2000.
- **Ogura, Y., D.K. Bonen, N. Inohara, D.L. Nicolae, F.F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R.H. Duerr, J.P. Achkar, S.R. Brant, T.M. Bayless, B.S. Kirschner, S.B. Hanauer, G. Nuñez, and J.H. Cho.** A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411:603-606, 2001.
- **Ogushi, K., A. Wada, T. Niidome, N. Mori, K. Oishi, T. Nagatake, A. Takahashi, H. Asakura, S. Makino, H. Hojo, Y. Nakahara, M. Ohsaki, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, J. Moss, and T. Hirayama.** Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem* 276:30521-30526, 2001.
- **Panés, J.** Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. *Acta Physiol Scand* 173:169-165, 2001.
- **Rogler, G., K. Brand, D. Vogl, S. Page, R. Hofmeister, T. Andus, R. Knuechel, P.A. Baurle, J. Schölmerich, and V. Gross.** Nuclear Factor κ B Is Activated in Macrophages and Epithelial Cells of Inflamed Intestinal Mucosa. *Gastroenterology* 115:357-369, 1998.
- **Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Ehrlich.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988.
- **Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-67, 1977.
- **Schibli, D.J., H.N. Hunter, V. Aseyev, T.D. Starner, J.M. Wiencek, P.B. McCray, Jr., B.F. Tack, and H.J. Vogel.** The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 277:8279-8289, 2002.
- **Schottelius, A.J.G., and A.S. Baldwin, Jr..** A role for transcription factor NF- κ B in intestinal inflammation. *Int J Colorec Dis* 14:18-28, 1999.

- **Schreiber, S.** Pathophysiologie. In: Stange E.F., S. Berndt, H.P. Bruch, A. Brüning, W.E. Fleig, H. Schimmelpenning, J. Schölmerich, und S. Schreiber. Colitis ulcerosa – Morbus Crohn. *UNI-MED Verlag*, 1. Auflage: 14-31, Bremen, 1999.
- **Schreiber, S., S. Nikolaus, and J. Hampe.** Activation of nuclear factor κ B in inflammatory bowel disease. *Gut* 42:477-484, 1998.
- **Sears, L.E., L.S. Moran, C. Kissinger, T. Creasey, H. Perry-O’Keefe, M. Roskey, E. Sutherland, and B.E. Slatko.** Circum Ventthermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable Vent_R(exo-)DNA-Polymerase. *Biotechniques* 13:626-33, 1992.
- **Shanahan, F.** Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut* 48:609, 2001.
- **Singh, P.K., H.P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L.Liu, B.A.D. Conway, E.P. Greenberg, E.V. Valore, M.J. Welsh, T. Ganz B.F. Tack, and P.B. McCray.** Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14961-14966, 1998.
- **Slatko, B.E.** Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Meth Mol Biol* 31:35-45, 1994.
- **Swidinski, A., A. Ladhoff, A. Pernthaler, S. Swidinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel, and H. Lochs.** Mucosal Flora in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 122:44-54, 2002.
- **Tak, P.P., and G.S. Firestein.** NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107:7-11, 2001.
- **Targan, S.R., S.B. Hanauer, S.J. van Deventer, L. Mayer, D.H. Present, T. Braakmann, K.L. De Woody, T.F. Schaible, and P.J. Rutgeerts.** A short term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn’s disease. *N Engl J Med* 337:1029-1035, 1997.
- **Tysk, C., H. Riedesel, E. Lindberg, B. Panzini, D. Podolsky, and G. Järnerot.** Colonic Glycoproteins in Monozygotic Twins With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 100: 419-423, 1991.
- **van Deventer, S.J.** Tumour necrosis factor and Crohn’s disease. *Gut* 40:443-448, 1997.

- **Wada, A., K. Ogushi, T. Kimura, H. Hojo, N. Mori, S. Suzuki, A. Kumatori, M. Se, Y. Nakahara, M. Nakamura, J. Moss, and T. Hirayama.** Helicobacter pylori-mediated transcriptional regulation of the human β -defensin 2 gene requires NF- κ B. *Cell Microbiol* 3:115-123, 2000.
- **Wada, A., N. Mori, K. Oishi, H. Hojo, Y. Nakahara, Y. Hamanaka, M. Nagashima, I. Sekine, K. Ogushi, T. Niidome, T. Nagatake, J. Moss, and T. Hirayama.** Induction of human beta-defensin-2 mRNA expression by Helicobacter pylori in human gastric cell line MKN45 cells on cag pathogenicity island. *Biochem Biophys Res Commun* 263:770-774, 1999.
- **Wehkamp, J., J. Harder, M. Weichenthal, O. Mueller, K.R. Herrlinger, K. Fellermann, J.M. Schroeder, and E.F. Stange.** Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 9:215-23, 2003.
- **Wehkamp, J., K. Fellermann, K.R. Herrlinger, S. Baxmann, K. Schmidt, B. Schwind, M. Duchrow, C. Wohlschläger, A.C. Feller, and E.F. Stange.** Human Beta-Defensin 2 But Not Beta-Defensin 1 Is Expressed Preferentially In Colonic Mucosa Of Inflammatory Bowel Disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14:745-752, 2002.
- **Zhang, G., and S. Gosh.** Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107:13-19, 2001.
- **Zhao, C., I. Wang, and R.I. Lehrer.** Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 396:319-22, 1996.

8 Anhänge

8.1 Anhang 1: Ergebnisse der Sequenzierung

A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; Bevins: Vergleichssequenz nach Bevins et al.; pro1: HBD 2-Pro1; pro2: HBD 2-Pro2; CU: Colitis ulcerosa; MC: Morbus Crohn; K: Kontrolle; KE: Kontrolle, entzündet.

Anmerkung:

Die Nummerierung der Positionen richtet sich nach der Vergleichssequenz.

Die Proben sind nach Entnahme chronologisch mit Nummern bezeichnet worden, diese Benennung wurde beibehalten.

	1925	1935	1945	1955	1965	1975
Bevins	ACATTCCCTG	AGTGACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
5pro1CU	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
19pro1CU	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
24pro1CU	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	AGCCACCTCC
35pro1CU	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
52pro1CU	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
83pro1CU	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
94pro1CU	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
107pro1CU	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
22pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
28pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
38pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGTGGTA	GGCCACCTCC
53pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
79pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
84pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
99pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
110pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
8pro1K	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
10pro1K	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
20pro1K	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	TCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
41pro1K	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
29pro1KE	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGAGTGGTA	GGCCACCTCC
69pro1KE	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
100pro1KE	-----	----TAGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
9pro1K	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCG-GTGGTA	GGCCACCTCC
59pro1K	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC
85pro1MC	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCG-GTGGTA	GGCCACCTCC
51pro1KE	-----	----ACGGTG	TGAATGGAAG	GAACTCAAGT	GCGGGTGGTA	GGCCACCTCC

 2345 2355 2365 2375 2385 2395
Bevins	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
5pro1CU	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
19pro1CU	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
24pro1CU	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
35pro1CU	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
52pro1CU	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
83pro1CU	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
94pro1CU	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
107pro1CU	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
22pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
28pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTATCAC
38pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
53pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
79pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
84pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
99pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
110pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
8pro1K	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
10pro1K	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
20pro1K	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
41pro1K	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
29pro1KE	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
69pro1KE	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
100pro1KE	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
9pro1K	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
59pro1K	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
85pro1MC	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC
51pro1KE	CACAGAGTGG	GCAGCAGGTG	AGTGGCAGGT	TATAGGTCTT	GAGTTTGAGT	TTGTTCTCAC

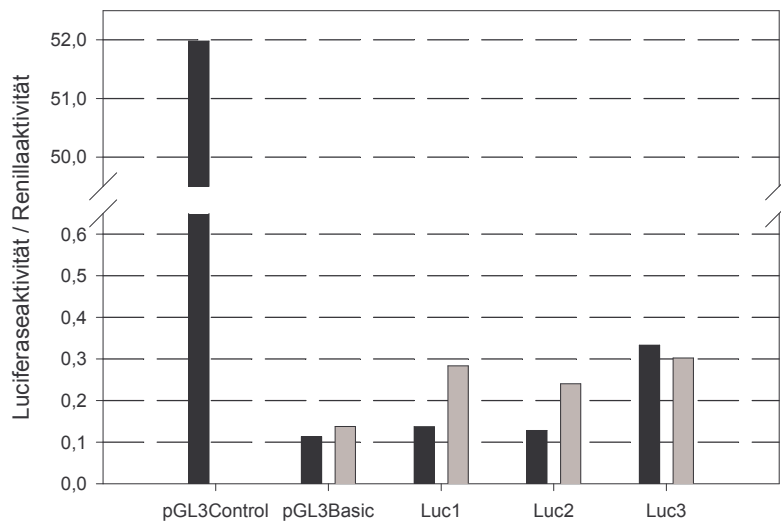
 2405 2415 2425 2435 2445 2455
Bevins	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTCCATTC	ACACACTGGG	TTTTAAATGG	TGCAAGATAG
5pro1CU	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
19pro1CU	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
24pro1CU	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
35pro1CU	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
52pro1CU	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
83pro1CU	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
94pro1CU	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACAA-----	-----	-----	-----
107pro1CU	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
22pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
28pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
38pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
53pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
79pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
84pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
99pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
110pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
8pro1K	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
10pro1K	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
20pro1K	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
41pro1K	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
29pro1KE	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
69pro1KE	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
100pro1KE	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
9pro1K	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
59pro1K	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
85pro1MC	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----
51pro1KE	GTGAGACAGA	CCCAGCCCCT	CACTC-----	-----	-----	-----

 2825 2835 2845 2855 2865 2875
Bevins	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CACCTATCTC
5pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
19pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
24pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
34pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
35pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
52pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
83pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
93pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
94pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
107pro2CU	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
22pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
28pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
38pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
53pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
79pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
84pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
85pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
99pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
110pro2MC	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
8pro2K	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
9pro2K	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
10pro2K	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
20pro2K	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
41pro2K	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
59pro2K	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
29pro2KE	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
51pro2KE	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
69pro2KE	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----
100pro2KE	GCCAAATGGA	AGAATGGCGT	AGAAGTTCTC	TGTCTCCTCT	CATTCCCCTC	CA-----

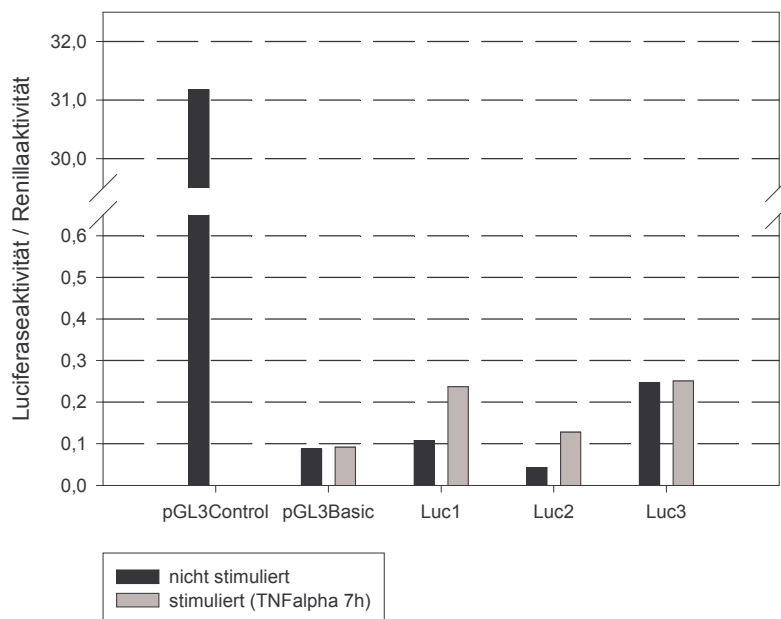
8.2 Anhang 2: Dual-Luciferase-Assay (Versuche 1 und 2)

pGL3Control: pGL3-Control-Plasmid; pGL3Basic: pGL3-Basic-Plasmid; Luc1: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc1; Luc2: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc2; Luc3: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc3.

Versuch 1



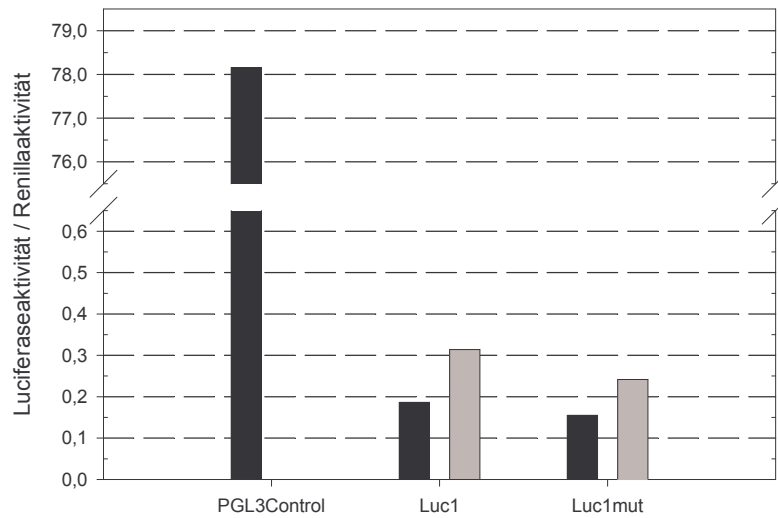
Versuch 2



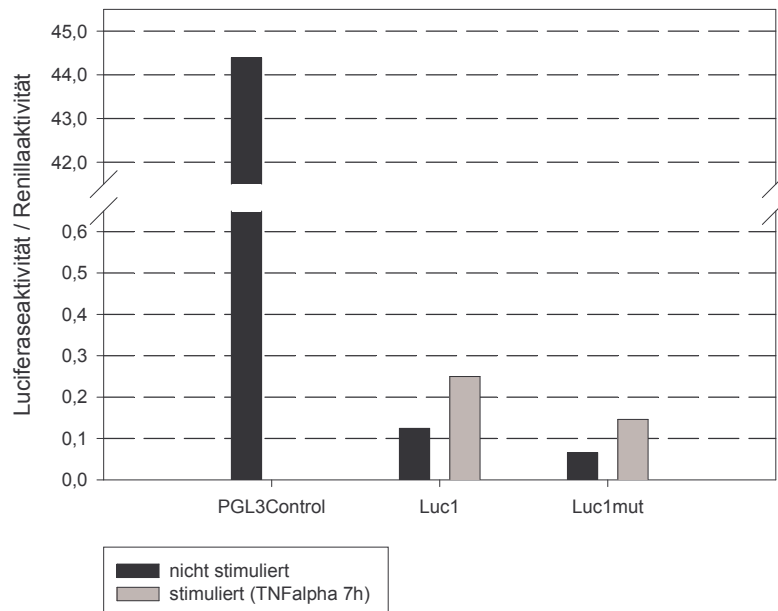
8.3 Anhang 3: Dual-Luciferase-Assay (Versuche 4 und 5)

pGL3Control: pGL3-Control-Plasmid; Luc1: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc1; Luc1mut: Reportervektor mit einkloniertem Fragment HBD 2-Luc1mut.

Versuch 4



Versuch 5



9 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand in der Klinik für Innere Medizin I, Bereich Gastroenterologie, der Universität zu Lübeck.

Ich danke allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanke ich mich bei:

Herrn PD Dr. med. Diether Ludwig für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des finanziellen Rahmens dieser Arbeit,

Herrn Dr. med. Rolf Dietrich Klingenberg-Noftz für die gute Betreuung,

Herrn Dr. rer. nat. Thomas Hellwig-Bürgel aus dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck für seine außergewöhnliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Bewältigung der sich stellenden Probleme bei der Generierung der Reporterplasmide und der Durchführung der Reporteragenassays,

Frau Katia La Ferla und Frau Rita Meuer für die Einarbeitung in die Zellkultur, die Elektroporation und die Reporteragenassays,

Herrn Dr. rer. nat. Michael Duchrow aus der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck für seine Hilfe bei der Sequenzierung und der Klonierung der Vektoren,

Frau Regina Kaatz und Frau Vera Grobleben für die Einarbeitung in mikrobiologische Techniken und für die große Unterstützung bei der Sequenzierung,

Frau Stefanie Wichmann für die Einführung in die Laborarbeit und das angenehme Arbeitsklima,

meinen Mitdoktorandinnen Kim Luley und Caroline Pilz für die freundschaftliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit

und nicht zuletzt Dr. med. Klaus Fellermann vom Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart für seine Einsatzbereitschaft und große Hilfe bei der Konzeption der Arbeit und allen sich ergebenden Schwierigkeiten.

10 Publikationsliste

Wissenschaftlicher Vortrag:

Steppat, M., R.D. Klingenberg, J. Wehkamp, M. Duchrow, S. Baxmann, D. Ludwig, E.F. Stange and K. Fellermann (Medical University of Lübeck, Lübeck, Germany). Are variations in the putative promoter region of human beta-defensin 2 (HBD-2) responsible for its differential expression in inflammatory bowel disease (IBD)? *9th United European Gastroenterology Week*, Session 61: Genetics in IBD, Amsterdam, 2001.

Posterpräsentation:

Steppat, M., R.D. Klingenberg, J. Wehkamp, M. Duchrow, S. Baxmann, D. Ludwig, E.F. Stange und K. Fellermann. Molekulargenetische Analyse der Promotorregion des Humanen-Beta-Defensin 2 (HBD-2) bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). *Z Gastroenterol* 39:643, 2001. (Abstract)

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Steppat
Vornamen: Michael Helmut
Geburtsdatum: 15. März 1977
Geburtsort: Bonn
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 - 1987 Grundschule in Bonn
1987 - 1996 Privates Ernst-Kalkuhl-Gymnasium in Bonn
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

01.07.1996 bis 30.07.1997 Krankenpflege im Johanniter-Krankenhaus in Bonn,
Abteilung für Innere Medizin

Hochschulbildung

Ab Oktober 1997 Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
September 1999 Ärztliche Vorprüfung
September 2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung