

# **Charakterisierung der antimikrobiellen Aktivität von High-mobility group box 2**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim**

Institut für Physiologie  
Fg. Membranphysiologie

und

Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für  
Klinische Pharmakologie

vorgelegt von  
**Robert Küchler**

aus Berlin-Spandau

2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer  
1. berichtende Person: PD Dr. med. Jan Wehkamp  
2. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang R. L. Hanke  
Eingereicht am: 10.12.2012  
Mündliche Prüfung am: 27.02.2013

Die vorliegende Arbeit wurde am 01.02.2013 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Summary</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
3.1 Anatomie des Gastrointestinaltraktes .....	8
3.2 Mikrobielle Flora und Umgebungsbedingungen im Gastrointestinaltrakt .....	9
3.3 Das Immunsystem .....	10
3.3.1 Das adaptive Immunsystem .....	11
3.3.2 Das angeborene Immunsystem.....	11
3.4 Antimikrobielle Peptide und Proteine .....	12
3.4.1 Defensine.....	13
3.4.2 Cathelizidine.....	15
3.4.3 Bactericidal/Permeability Increasing Protein .....	15
3.4.4 RNase A Superfamilie.....	16
3.4.5 Histone .....	16
3.5 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen .....	17
3.6 High-mobility group Superfamilie .....	19
3.6.1 HMGA.....	19
3.6.2 HMGN.....	19
3.6.3 HMGB .....	20
3.6.3.1 HMGB1 .....	21
3.6.3.2 HMGB2 .....	23
3.7 Ziele der Arbeit.....	25
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
4.1 Material.....	27
4.1.1 Geräte .....	27
4.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Proteine und Standards.....	29
4.1.3 Kits .....	33
4.1.4 Verbrauchsmaterial .....	33
4.1.5 Programme .....	34
4.2 Methoden.....	35
4.2.1 Bakterienstämme .....	35
4.2.2 Biologisches Material.....	35
4.2.3 Aufarbeitung der Gewebeproben für Proteinanalysen .....	36
4.2.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
4.2.5 Coomassie Färbung .....	38
4.2.6 Silberfärbung .....	39
4.2.7 Westernblot .....	40
4.2.8 Aufarbeitung von Stuhlproben und Dot blot.....	42
4.2.9 Rekombinante Expression von HMGB2, A-Box, B-Box und C-Terminus .....	43
4.2.9.1 Klonierung.....	43
4.2.9.2 Transformation, Expression in BL21-Zellen und Lyse der Zellen.....	47

4.2.9.3	Aufreinigung und Dialyse der Fusionsproteine .....	48
4.2.9.4	SUMO-Protease Verdau der Fusionsproteine .....	50
4.2.9.5	Aufreinigung der rekombinanten Proteine .....	50
4.2.10	Analyse der Reinheit der rekombinanten Proteine mit Hilfe der HPLC .....	52
4.2.11	Radial Diffusion Assay .....	52
4.2.12	Trübungsassay .....	55
4.2.13	Immunhistochemie .....	56
4.2.14	Transmissionselektronenmikroskopie .....	58
4.2.15	Durchflusszytometrische Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität.....	59
4.2.16	Sequenzierungen .....	60
4.2.17	Analyse der mRNA-Expression .....	61
4.2.17.1	Isolierung von RNA und cDNA-Synthese.....	61
4.2.17.2	Konstruktion der Plasmide.....	62
4.2.17.3	Restriktionsverdau der Plasmide.....	63
4.2.17.4	Real-time PCR .....	64
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
5.1	Rekombinante Expression von HMGB2 .....	66
5.2	Charakterisierung des antimikrobiellen Aktivitätsspektrums von HMGB2.....	68
5.3	Verifizierung der antimikrobiellen Aktivität mittels Trübungsassay .....	71
5.4	Elektronenmikroskopische Analyse von HMGB2-behandelten <i>S. aureus</i> .....	73
5.5	Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität von HMGB2 .....	74
5.6	Identifizierung der für die antimikrobielle Aktivität essentiellen Bereiche von HMGB2 .....	76
5.7	mRNA-Expression von HMGB2.....	80
5.8	Proteinexpression von HMGB2.....	81
5.8.1	Westernblot .....	81
5.8.2	Immunhistochemie .....	83
5.9	Expression von HMGB2 bei CED.....	85
5.9.1	mRNA-Expression von HMGB2 bei CED .....	85
5.9.2	Proteinexpression von HMGB2 bei CED .....	87
5.10	Nachweisbarkeit von HMGB2 im Stuhl .....	88
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
6.1	Antimikrobielle Aktivität von HMGB2 .....	90
6.2	Expression von HMGB2 im Gastrointestinaltrakt.....	93
6.3	Expression von HMGB2 bei CED.....	94
6.4	Nachweisbarkeit von HMGB2 im Stuhl von CED-Patienten .....	95
6.5	Die Rolle der antimikrobiellen Aktivität des HMGB2 im Gastrointestinaltrakt.....	96
6.6	Identifizierung der für die antimikrobielle Aktivität essentiellen Bereiche von HMGB2 .....	98
6.7	Technische Aspekte der rekombinanten Expression .....	100
6.8	HMGB2 als antimikrobieller Wirkstoff in der Therapie von Infektionen.....	103
6.9	Weiterführende Arbeiten .....	105
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>119</b>

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle verwendeten Zitate oder Inhalte anderer Autoren sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Stuttgart, Dezember 2012

---

## Abkürzungsverzeichnis

AcN	Acetonitril
AMP	Antimikrobielles Peptid / Protein
APS	Amoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure(n)
BPI	Bactericidal/Permeability Increasing Protein
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CU	Colitis ulcerosa
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIBAC	Bis-(1,3-Dibutyl-barbitursäure)-Trimethinoxonol
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDN	Eosinophil-Derived Neurotoxin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
hBD	humanes $\beta$ -Defensin
HCl	Hydrogenchlorid
HD	humanes $\alpha$ -Defensin
HMG	High-mobility group
HMGA	High-mobility group-AT-Hook
HMGB	High-mobility group box
HMGN	High-mobility group-nucleosome binding
HNP	Human Neutrophil Peptide
HPLC	High-performance liquid chromatography
IL-1	Interleukin-1
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria Broth
LPS	Lipopolysaccharid
MC	Morbus Crohn
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optische Dichte
PBS(T)	Phosphate Buffered Saline (Tween)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRR	Pattern Recognition Receptors
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RDA	Radial Diffusion Assay
rek	rekombinant
(m)RNA	(Messenger) Ribonucleic acid
RP	Reversed Phase
SDS(-PAGE)	Sodium dodecyl sulfat (-polyacrylamide gel electrophoresis)
SOC	Super Optimal Broth (Catabolite repression)
SUMO	Small-Ubiquitin-Like Modifier
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-Buffered Saline-Tween
TCF-4	Transcription factor 4
TFA	Trifluoracetic acid
TLR	Toll-like Receptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSB	Tryptic Soy Broth

Einheiten: Mikroliter ( $\mu$ l), Milliliter (ml), Liter (l), Sekunde (s), Minute (min), Stunde (h), Nanogramm (ng), Mikrogramm ( $\mu$ g), Gramm (g), Mikromolar ( $\mu$ M), Millimolar (mM), Molar (M), Gewichtsprozent (% (w/v)), Volumenprozent (% (v/v)), Grad Celsius ( $^{\circ}$ C), Nanometer (nm), Millimeter (mm), Volt (V), Ampere (A), Umdrehungen pro Minute (rpm), Colony-forming-units (CFU), Milli-absorbance-units (mAU), Basenpaare (bp), Kilobasenpaare (kb), Dalton (Da), Kilodalton (kDa)

# 1. Zusammenfassung

Der menschliche Organismus ist kontinuierlich großen Mengen an Mikroorganismen ausgesetzt. Besonders die Oberflächen, wie die Haut und die Mukosa des Gastrointestinaltraktes kommen in engen Kontakt mit einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterien, Viren und Pilze. Das besonders stark ausgeprägte Immunsystem des Darms schützt die Mukosa vor einer Überwucherung mit kommensalen Bakterien und dem Eindringen von Pathogenen. Neben einer effektiven Barriere durch Mukus spielen antimikrobielle Proteine und Peptide (AMPs) eine entscheidende Rolle in der Verteidigung gegen Mikroorganismen, indem sie das Wachstum dieser einschränken oder sie sogar abtöten.

Im Jahr 2009 konnte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit nachweisen, dass High-mobility group box 2 (HMGB2) antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* besitzt. In dieser Doktorarbeit wurde die neue Funktion des HMGB2 genauer charakterisiert. Das Protein wurde dazu rekombinant hergestellt und zeigte Aktivität gegen verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien der normalen Darmflora. Zusätzlich konnte mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Analysen gezeigt werden, dass HMGB2 das Wachstum von *Staphylococcus aureus* negativ beeinflusst und bakterizide Wirkung gegen dieses pathogene Bakterium besitzt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der im Darm vorliegenden Umgebungsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität von HMGB2 untersucht. Durch Änderungen des pH-Werts und der Generierung eines reduzierenden Milieus konnten keine signifikanten Änderungen der Aktivität ermittelt werden. Die rekombinante Expression von drei Peptiden, die drei Abschnitten des Proteins entsprechen und dem anschließenden Aktivitätsscreening gegen *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die beiden DNA-Bindedomänen (HMG-Box A und B) die Aktivität vermitteln. Eine Analyse der Expression im Gastrointestinaltrakt zeigte, dass HMGB2 in allen untersuchten Magen- und Darmabschnitten vorhanden ist. Darüber hinaus wurde die HMGB2-Expression bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen zwischen Kontroll-, Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten festgestellt werden. Die Analyse von Stuhl der Patienten zeigte allerdings, dass HMGB2 in einem Teil der Proben detektiert werden konnte und eventuell als Marker für intestinale Entzündungen verwendet werden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass HMGB2 antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene kommensale Bakterien der normalen Darmflora besitzt und in allen untersuchten Abschnitten des Magen-Darm-Trakts exprimiert wird. HMGB2 ist Bestandteil

der Darmbarriere und gemeinsam mit anderen AMPs an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt.

## 2. Summary

The human body is continuously exposed to an enormous amount of microbes. Especially surfaces like the skin or the gastrointestinal mucosa are in close contact with large numbers of microorganisms, including bacteria, fungi and viruses. A very effective innate immune system protects the intestinal mucosa from an overgrowth of commensal bacteria and penetration by pathogenic microbes. Besides an efficient layer of thick mucus, antimicrobial peptides and proteins (AMPs) which can inhibit the growth of microorganisms or even destroy them are an essential part of the epithelial barrier. In 2009, as a part of my diploma thesis, I could show that high-mobility group box 2 (HMGB2) exhibits antimicrobial activity against *E. coli*. The aim of this PhD thesis was to characterize and further clarify this new function. HMGB2 was recombinantly expressed and systematically analyzed for antimicrobial activity. Notably, several gram-negative and gram-positive bacteria of the normal gut flora were critically affected by HMGB2. In addition, bactericidal properties against the pathogenic bacterial strain *Staphylococcus aureus* were detected via electron microscopic analysis. Furthermore potential influences of intestinal environmental conditions on the activity of HMGB2 were investigated. Changes in the pH or the generation of a reducing environment altered the activity of the protein only to a small amount. To localize the part of HMGB2 which is essential for its antimicrobial activity, three peptides which represent three regions of the protein were recombinantly expressed. An activity screening with the three peptides showed that the two DNA-binding-domains HMG-Box A and B are crucial for the antimicrobial effects. An expression study showed that HMGB2 is present in all analyzed stomach and intestinal sections. In addition, the expression in patients with inflammatory bowel disease (IBD) was studied. No significant differences between patients with Crohn's disease, ulcerative colitis and unaffected controls were detected. However, the examination of stool from individuals of these three groups suggests that HMGB2 might be useful as a new marker for intestinal inflammation.

In summary, HMGB2 exhibits antimicrobial activity against various commensal bacteria of the normal gut flora and is expressed in all analyzed gastrointestinal tract sections. HMGB2 is part of the intestinal barrier and protects, together with other AMPs, the intestine from microorganisms.

### **3. Einleitung**

In den Organen des Magen-Darm-Traktes erfolgen die Resorption von Nahrungsbestandteilen sowie die Rückresorption von Wasser. Damit diese Aufgaben mit hoher Effektivität ausgeführt werden können ist die Oberfläche des Darms durch die Ausbildung von Darmzotten und Mikrovilli stark vergrößert (Campbell et al., 2003). Die große Oberfläche bietet jedoch auch den mit der Nahrung aufgenommenen Mikroorganismen und kommensalen Bakterien eine enorme Angriffsfläche. So umfasst die normale humane Darmflora zwischen 10 und 100 Billionen Bakterienzellen und enthält Vertreter diverser Bakterienspezies (Camp et al., 2009). Obwohl die Schleimhäute kontinuierlich einer enormen Anzahl von verschiedensten Mikroorganismen ausgesetzt sind, kommt es nur selten zu akuten und chronischen Infektionen. Eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems ist, die Bakterien der gesunden Darmflora zu tolerieren und trotzdem Schutz gegenüber Pathogenen zu bieten (Magalhaes et al., 2007; Hooper and Macpherson, 2010). Neben einer effektiven Barriere durch verschiedene Zellschichten und Mukus spielen antimikrobielle Peptide und Proteine eine entscheidende Rolle in der Abwehr gegen Mikroorganismen (Zasloff, 2002; Magalhaes et al., 2007). Diese endogen synthetisierten Antibiotika sind in der Lage, Bakterien, Viren und Pilze abzutöten und werden von Pflanzen und Tieren in großer Vielzahl produziert (Zasloff, 2002). Dysregulationen, die zu einer verminderten Verfügbarkeit von antimikrobiellen Peptiden führen, konnten mit der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert werden. Dies verdeutlicht die enorme Wichtigkeit dieser Effektormoleküle (Wehkamp et al., 2004, 2005). Es werden kontinuierlich neue antimikrobielle Peptide und Proteine aus unterschiedlichen Organismen isoliert und identifiziert. Neben zytoplasmatischen und extrazellulären Proteinen konnte in den letzten Jahren auch Aktivität von nukleären Proteinen, wie Histonen oder Proteinen der High-mobility group Superfamilie, die durch ihre regulatorischen Funktionen im Zellkern bekannt wurden, nachgewiesen werden (Zetterström et al., 2002; Feng et al., 2005b; Kawasaki and Iwamuro, 2008; Küchler, 2009).

#### **3.1 Anatomie des Gastrointestinaltraktes**

Die ersten Abschnitte des Gastrointestinaltraktes werden als Cavitas oris (Mundhöhle), Pharynx (Rachen) und Ösophagus (Speiseröhre) bezeichnet (Lippert, 2000). Es folgt der Gaster (Magen), der sich in vier nicht durch scharfe Grenzen voneinander getrennte Abschnitte unterteilen lässt. Nach der Cardia (Mageneingang), dem Übergang zwischen

Ösophagus und Gaster, folgen Fundus gastricus (Magenkuppel) und der größte Abschnitt des Magens, Corpus gastricum (Magenkörper). Der letzte Abschnitt, vor dem Übergang in den Dünndarm, das Pars pylorica (Pfortnerabschnitt) setzt sich aus dem Antrum pyloricum und dem Pylorus (Magenpfortner) zusammen. Der Pylorus zeichnet sich durch eine stark ausgeprägte Ringmuskulatur aus, die es ihm ermöglicht, den Übergang vom Magen in den Darm zu verschließen. Der Darm lässt sich beim Menschen in den Dünndarm und Dickdarm unterteilen. Der Dünndarm umfasst das Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) sowie Ileum (Krummdarm). Dem Ileum schließt sich der Dickdarm an, der sich in Caecum (Blinddarm) mit Appendix vermiformis (Wurmfortsatz), Colon (Grimmdarm) und Rectum (Mastdarm) unterteilen lässt (Lippert, 2000).

Die Wand des Ösophagus und die der Abschnitte des Magen-Darm-Traktes ist grundsätzlich gleich aufgebaut und lässt sich von innen nach außen in vier Schichten unterteilen. Die erste Schicht, die Mukosa (Schleimhaut) kann weiter in das Epithel (Lamina epithelialis), Lamina propria (Lamina Propria) und Muscularis mucosae (Lamina muscularis mucosae) untergliedert werden. Es folgen die Submukosa (Tela submucosa), Muskularis (Tunica muscularis) und die Serosa (Tunica serosa) (Lüllmann-Rauch, 2009).

### **3.2 Mikrobielle Flora und Umgebungsbedingungen im Gastrointestinaltrakt**

Aufgrund der hohen Salzsäurekonzentration und des daraus resultierenden niedrigen pH-Werts von 2 ist der Magen fast frei von Mikroorganismen. Durch Kultivierung lassen sich jedoch Laktobazillen, Streptokokken, Staphylokokken sowie Enterobakterien nachweisen (Bischoff, 2009). Im Duodenum und Jejunum ist die Keimdichte mit  $10^3$  bis  $10^4$  Bakterien pro ml Darminhalt immer noch sehr niedrig. Im distalen Dünndarm lassen sich hauptsächlich Laktobazillen, Streptokokken und Enterobakterien wie zum Beispiel *Escherichia coli* finden. Während dem Transport des Chymus im Dünndarm steigt die Bakteriendichte, wahrscheinlich durch die geringe Peristaltik, weiter an. Im Ileum sind bereits  $10^8$  bis  $10^9$  Bakterien pro ml Chymus nachweisbar (I. B, Autenrieth, 2003). Die Zusammensetzung der Flora wird maßgeblich durch die Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel den pH-Wert und Sauerstoffgehalt, bestimmt. Der pH-Wert im Duodenum beträgt 5,7 bis 6,4, steigt jedoch entlang des Dünndarms aufgrund der Sekretion von Bikarbonaten durch Epithelzellen an und erreicht im Ileum einen Wert von 7,3 bis 7,7. In der Menge des verfügbaren Sauerstoffs gibt

es ebenfalls erhebliche Gradienten im Gastrointestinaltrakt. Der hohe Sauerstoffgehalt des Magens wird durch den bakteriellen Stoffwechsel im Darm zunehmend reduziert und beträgt an der Mukosaoberfläche des Dünndarms nur noch 22 % des Luftsauerstoffs (Wilson, 2004). Durch den hohen mikrobiellen Stoffwechsel sinkt der Sauerstoffgehalt im Colon weiter ab, so dass im Lumen ein anaerobes Milieu mit einem Redoxpotential von -200 mV bis - 300 mV vorliegt. Die bakterielle Fermentation von Kohlenhydraten zu kurzkettigen Fettsäuren führt dazu, dass der pH im Dickdarm abfällt und im Caecum einen Wert von 5,7 erreicht. Entlang des Colon steigt der pH durch die Sekretion von Bikarbonaten und die Aufnahme der Fettsäuren wieder bis auf 6,6 an (Wilson, 2004). Der niedrige Sauerstoffgehalt führt dazu, dass im Dickdarm hauptsächlich obligate Anaerobier wie Bifidobakterien, Eubakterien und Clostridien sowie fakultative anaerobe Bakterien, wie zum Beispiel Enterobakterien, zu finden sind. Mit  $10^{11}$  bis  $10^{12}$  Bakterien pro ml Darminhalt ist die Dichte an Mikroorganismen deutlich angestiegen (I. B, Autenrieth, 2003).

Normalerweise stellt die enorme Besiedelung des Gastrointestinaltraktes durch Bakterien keinen Nachteil für den menschlichen Organismus dar, sondern hat sogar zahlreiche positive Effekte auf verschiedene Darmfunktionen. Zum Beispiel ist das Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* in der Lage verschiedene Glykosylhydrolasen herzustellen, die pflanzliche Polysaccharide abbauen und dadurch dem Wirt den Zugang zu dieser Kohlenhydratquelle ermöglichen (Xu et al., 2003).

### **3.3 Das Immunsystem**

Das Immunsystem schützt den Organismus vor verschiedenen Pathogenen, wie Viren, Pilzen, Parasiten und Bakterien. Bei Säugetieren lässt es sich in das angeborene (innate immunity) und das erworbene Immunsystem (adaptive immunity) unterteilen (Medzhitov and Janeway, 1997). Das angeborene Immunsystem ist in der Evolution bereits sehr früh entstanden. Es ist in unterschiedlichen Ausprägungen in allen mehrzelligen Organismen zu finden und wirkt unspezifisch gegen Bakterien und andere Mikroorganismen. Das erworbene Immunsystem ist hingegen phylogenetisch deutlich jünger und nur bei höheren Vertebraten zu finden. Es kann spezifische Strukturen (Antigene) von Mikroorganismen erkennen und eine gerichtete Verteidigung einleiten (Janeway, 1989; Hoffmann et al., 1999).

### **3.3.1 Das adaptive Immunsystem**

Das adaptive Immunsystem des menschlichen Organismus umfasst verschiedene Zelltypen, die unterschiedliche Aufgaben ausüben. Zwei wesentliche Komponenten stellen die B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) dar. B-Lymphozyten sind in der Lage gegen spezifische Antigene gerichtete Antikörper herzustellen. Binden die Antikörper das Antigen, bei dem es sich zum Beispiel um einen Membranbestandteil eines Mikroorganismus handeln kann, wird dieser dadurch für die Zerstörung durch weitere Komponenten des Immunsystems markiert. Darüber hinaus können an Mikroorganismen gebundene Antikörper die Anlagerung von diesen an körpereigene Zellen blockieren. T-Lymphozyten können von körpereigenen Zellen präsentierte Antigene, zum Beispiel virale Bestandteile, direkt erkennen und daraufhin die Zerstörung dieser Zellen einleiten (Oh and Lee, 2012). Das Darm-assoziierte Immunsystem (gut-associated lymphoid tissue) ist besonders stark ausgeprägt und enthält die größte Ansammlung von lymphatischen Geweben. Zusätzlich zu den gut strukturierten mesenchymalen Lymphknoten und Peyer-Plaques enthält es diffus im Epithel und der Lamina Propria verteilte Lymphozyten, einschließlich großer Mengen von  $IgA^+$  produzierenden Plasmazellen (Forchielli and Walker, 2005). Obwohl die zahlreichen Mikroorganismen im Darmlumen und die Zellen des Epithels nur durch wenige Mikrometer Mukus voneinander getrennt sind, kommen chronische Entzündungen des Darms nur selten vor. Wahrscheinlich spielen immun-suppressive Zytokine sowie negative Regulatoren der T-Zellen dabei eine wichtige Rolle (Read et al., 2000). Das adaptive Immunsystem ist sehr effektiv und hoch spezifisch, benötigt jedoch einige Tage um seine volle Wirkung zu entfalten.

### **3.3.2 Das angeborene Immunsystem**

Wenn ein Organismus pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt ist, müssen diese möglichst umgehend erkannt und bekämpft werden. Das angeborene Immunsystem kann ohne lange Vorlaufzeit direkt auf Bedrohungen reagieren. Eine grundlegende Rolle spielen dabei spezielle Rezeptoren, die „pattern recognition receptors“ (PRRs). Diese Rezeptoren können essentielle und damit hoch konservierte Strukturen von verschiedenen Mikroorganismen, die sogenannten „pathogen associated molecular patterns“ detektieren und dadurch deren Präsenz wahrnehmen (Didierlaurent et al., 2002). Zwei wichtige Gruppen von PRRs, die im Darm eine entscheidende Rolle spielen, sind „Nucleotide-binding oligomerization domain“ (NOD)-Proteine und „Toll-like Receptor“ (TLR)-Proteine. NOD-Proteine werden unter anderem von

Panethzellen, spezialisierten sekretorischen Epithelzellen in den Krypten des Dünndarms, exprimiert und können sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien durch Bestandteile des Peptidoglykans erkennen und die Synthese bzw. Sekretion von Effektormolekülen einleiten (Chamaillard et al., 2003; Philpott and Girardin, 2004; Kobayashi et al., 2005). TLRs zeichnen sich durch extrazelluläre Domänen aus, die durch Ligandenbindung, zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS), dimerisieren können und dadurch aktiviert werden. Die Aktivierung löst diverse intrazelluläre Signalkaskaden aus, die zur Aktivierung von verschiedenen Verteidigungsmaßnahmen führen (Bowie and O'Neill, 2000; Beutler, 2004). Neben der Erkennung durch Rezeptoren gibt es weitere wichtige Komponenten im angeborenen Immunsystem. Ein Beispiel dafür ist der durch Becherzellen produzierte Mukus, der eine nahezu unüberwindbare Barriere für viele Mikroorganismen darstellt. Diese Schleimschicht enthält stark glykosylierte Proteine, die Muzine bezeichnet werden. Muzine weisen einen hohen Serin- und Threonin-Gehalt auf und sind mit verschiedenen Oligosaccharid-Seitenketten verknüpft (Kim and Ho, 2010). Normalerweise lassen sich Bakterien nur in der äußersten Mukusschicht nachweisen. Die inneren, an das Epithel angrenzenden Schichten sind nahezu steril (Kim and Ho, 2010). Störungen in der Muzinsynthese oder qualitative Veränderungen des Mukus können schwerwiegende Folgen haben und zur Entstehung von Krankheiten, wie Colitis ulcerosa, führen (Shirazi et al., 2000; Strugala et al., 2008). Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mechanismen werden von vielen Zelltypen Peptide und Proteine sekretiert, die in der Lage sind, das Wachstum von Mikroorganismen zu unterbinden oder diese sogar abzutöten. Im nächsten Kapitel werden diese Moleküle, die eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem einnehmen, genauer behandelt.

### **3.4 Antimikrobielle Peptide und Proteine**

Antimikrobielle Peptide und Proteine (AMP) sind ein essentieller Bestandteil in der Verteidigung gegen verschiedene Mikroorganismen. Diese Effektormoleküle sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet und in der Lage grampositive und gramnegative Bakterien sowie Pilze und Viren abzutöten (Zasloff, 2002; Gallo and Nizet, 2003). Da AMPs eine hohe Diversität aufweisen ist es schwierig diese in Gruppen einzuteilen (Zasloff, 2002). Zwei wesentliche Charakteristika, die jedoch in einer Vielzahl von AMPs zu finden sind, sind eine amphipathische Struktur und eine positive Nettoladung (Zasloff, 2002; Cederlund et al.,

2011). Bis heute wurden bereits mehr als 800 AMPs aus verschiedenen Organismen isoliert (Gallo and Nizet, 2003). Es gibt diverse Modelle, die die antimikrobielle Aktivität zu erklären versuchen. Bei dem wohl bekanntesten, durch Zasloff zusammengefassten Shai-Matsuzaki-Huang-Modell, binden die kationischen AMPs aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen an die negativ geladenen Phospholipid-Gruppen der Bakterienmembran. Es folgen strukturelle Veränderungen, die Einlagerung von AMPs in die Membran, die Entstehung von Mikroporen und die Depolarisierung der Zelle. Diese verliert daraufhin durch die entstandenen Poren essentielle zelluläre Bestandteile und Ionen. Weitere Prozesse werden aktiviert, wie die Induktion von Hydrolasen, was den Abbau der Zellwand zur Folge hat (Matsuzaki, 1999; Zasloff, 2002). Einige AMPs, wie zum Beispiel das Lysozym, besitzen enzymatische Aktivität. Dieses Protein kommt in verschiedenen humanen Sekreten, einschließlich dem Speichel und der Tränenflüssigkeit, vor. Darüber hinaus wird es von den Panethzellen des Dünndarms produziert und in das Lumen abgegeben. Lysozym ist in der Lage, die 1,4- $\beta$ -glykosidischen Verknüpfungen zwischen N-Acetylglukosaminen und N-Acetylmuraminsäure des Peptidoglykans in der Zellwand von Bakterien zu hydrolysieren und diese damit zu zerstören (Ganz, 2004; Mukherjee et al., 2008). Manche AMPs sind außerdem in der Lage wichtige Spurenelemente zu binden und dadurch die Verfügbarkeit von diesen für Mikroorganismen stark einzuschränken. Ein Beispiel ist das von neutrophilen Granulozyten sezernierte Calprotectin, welches Komplexe mit Zink und Mangan eingehen kann. Diese sind jedoch essentiell für die Aktivität von bestimmten bakteriellen Enzymen. Die Superoxiddismutase von *Staphylococcus aureus* ist beispielsweise ohne diese Spurenelemente nicht in der Lage, die von neutrophilen Granulozyten ausgeschütteten Superoxide zu katalysieren und damit unschädlich zu machen. Indem es die Superoxiddismutase, einen wichtigen Virulenzfaktor, inhibiert und dadurch die Sensitivität gegenüber Superoxiden erhöht, unterstützt Calprotectin die Superoxide in der Abwehr gegen Mikroorganismen (Corbin et al., 2008; Kehl-Fie et al., 2011). Im Folgenden werden wichtige AMPs und ihre Rolle im Gastrointestinaltrakt genauer vorgestellt.

### **3.4.1 Defensine**

Eine der wichtigsten Familien der AMPs der Säugetiere stellen die Defensine dar. Diese kleinen kationischen Peptide besitzen sechs Cysteine, mit denen sie intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Das Muster der Disulfidbrücken erlaubt die Einteilung in die zwei

Hauptgruppen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine (White et al., 1995). Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Defensine weisen bakterizide Eigenschaften auf und können grampositive sowie gramnegative Bakterien abtöten. Darüber hinaus zeigen einige Defensine sogar Aktivität gegen Viren, Pilze und Protozoen (Zasloff, 2002; Bevins and Salzman, 2011).

Bis heute wurden 6 humane  $\alpha$ -Defensine identifiziert. Vier Mitglieder dieser Familie, „human neutrophil peptides 1-4“ (HNP 1-4), werden von neutrophilen Granulozyten gebildet und dienen diesen zur Zerstörung von phagozytierten Mikroorganismen. HNPs werden als Propeptide synthetisiert, aus denen durch eine proteolytische Spaltung die aktive Form hervorgeht (Ganz et al., 1985; Ganz, 2003). Die beiden humanen  $\alpha$ -Defensine 5 und 6 (HD-5 und -6) werden hauptsächlich von Panethzellen sekretiert (Wehkamp et al., 2006). HD-5 wird in sekretorischen Vesikeln als Propeptid gespeichert und nach der Sekretion ins Lumen, ebenfalls durch eine proteolytische Spaltung durch Trypsin, in die aktive Form überführt (Ghosh et al., 2002). Mit Hilfe von transgenen Mäusen, die das humane HD-5 exprimieren, konnte die antimikrobielle Wirkung dieses Peptids bestätigt werden. Die transgenen Mäuse zeigten eine Resistenz gegen oral verabreichte *Salmonella tryphimurium*-Bakterien (Salzman et al., 2003). HD-6 wird in beachtlichen Mengen von den Panethzellen exprimiert. Da jedoch keine nennenswerte bakterizide Aktivität nachgewiesen werden konnte, blieb lange die Frage offen welchen Nutzen dieses Peptid für den Organismus hat. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass HD-6 an Bakterien bindet und durch Zusammenlagerung vieler Moleküle Netze ausbildet. Diese Netze schränken wahrscheinlich die Beweglichkeit der Bakterien stark ein und verhindern das Anheften an Epithelzellen, indem sie direkten Kontakt unterbinden (Chu et al., 2012).

Von der Familie der  $\beta$ -Defensine wurden bereits deutlich mehr Mitglieder identifiziert. Durch ein computergestütztes Verfahren konnten im Jahre 2002 28 neue  $\beta$ -Defensin-Gene im humanen Genom nachgewiesen werden (Schutte et al., 2002). Eine besondere Rolle scheinen im Gastrointestinaltrakt des Menschen jedoch nur die vier humanen  $\beta$ -Defensine 1-4 (hBD 1-4) zu spielen (Harder et al., 2007). hBD-1 und hBD-2 werden von Epithelzellen des Dün- und Dickdarms exprimiert und konnten in vielen weiteren Geweben nachgewiesen werden (Zhao et al., 1996; Bals et al., 1998). Beide Peptide wirken chemotaktisch auf dendritische Zellen und T-Zellen und können diese zum Ort der Entzündung rekrutieren (Yang et al., 1999, 2007). hBD-3 wird in verschiedenen Geweben und Epithelien exprimiert. Besonders hohe mRNA-Expressionslevel konnten in der Haut, in Mandeln und der Luftröhre detektiert werden (Harder et al., 2001). hBD-4 wurde noch nicht auf Proteinebene nachgewiesen, jedoch

konnte die Expression des Gens unter anderem in intestinalen Epithelzellen gezeigt werden (Fahlgren et al., 2004). In der Regulation der  $\beta$ -Defensine gibt es deutliche Unterschiede. Das hBD-1 wird im Colon konstitutiv exprimiert, die Expression von hBD-2, hBD-3 und hBD-4 wird dagegen erst während Entzündungsreaktionen induziert (Wehkamp et al., 2008).

### **3.4.2 Cathelizidine**

Eine weitere wichtige Klasse von AMPs der Säugetiere stellen die Cathelizidine dar. Im Menschen konnte bis heute nur ein Cathelizidin-Gen identifiziert werden (Gudmundsson et al., 1996). Das durch das Gen kodierte Protein heißt „human cationic antimicrobial peptide 18“ und wird unter anderem von neutrophilen Granulozyten gebildet. Durch die Proteinase 3 wird von diesem Vorläufer ein Peptid vom carboxy-terminalen Ende abgespalten, das LL-37 bezeichnet wird (Sørensen et al., 2001). LL-37 besitzt antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und -negative Bakterien und chemotaktische Wirkung auf eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie T-Zellen und Monozyten (Tjabringa et al., 2006). Mit Hilfe eines Maus Knock-out Modells konnte gezeigt werden, dass Cathelizidine eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen Mikroorganismen spielen. In diesem Modell, in dem das Homolog zum humanen LL-37 ausgeschaltet wurde, waren die Mäuse anfälliger für Hautinfektionen durch Streptokokken der Gruppe A (Nizet et al., 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass LL-37 in der Lage ist, einen durch LPS ausgelösten septischen Schock zu verhindern, indem es LPS bindet und die Endotoxin-Wirkung neutralisiert (Golec, 2007).

### **3.4.3 Bactericidal/Permeability Increasing Protein**

Das “Bactericidal/Permeability Increasing Protein” (BPI) ist mit 0,5 bis 1 % des Gesamtproteins ein wichtiger Bestandteil von Neutrophilen (Elsbach, 1998). Außerdem sind die Epithelien des Gastrointestinaltraktes und die des weiblichen Genitaltraktes in der Lage dieses Protein zu synthetisieren (Canny et al., 2006). BPI zeigt bereits im nanomolaren Bereich antimikrobielle Aktivität gegen ein großes Spektrum von gramnegativen Bakterien (Boman, 1995). BPI bindet mit einer hohen Selektivität an das Lipopolysaccharid A der äußeren Bakterienmembran. Diese Bindung führt zu einer Steigerung der Membranpermeabilität und der Hydrolyse von Phospholipiden durch bakterielle Phospholipasen und die Phospholipase A des Wirts. Indem es die Zellteilung unterbricht wirkt BPI anfangs bakteriostatisch. Nach einer gewissen Zeit kommt es jedoch zu einer irreversiblen

Wachstumshemmung und zu Schäden der inneren Bakterienmembran, die zum Zelltod führen (Elsbach, 1998).

### **3.4.4 RNase A Superfamilie**

RNasen können RNA verdauen und den Organismus dadurch vor den Gefahren, die von Fremd-RNA ausgehen, schützen. Neben dieser essentiellen Funktion besitzen einige RNasen weitere wichtige Aufgaben im Immunsystem. Mittlerweile konnte von 5 Mitgliedern dieser Familie antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden (Harder et al., 2007). Sowohl die RNase 2 (Eosinophil-derived neurotoxin, EDN) als auch die RNase 3 (Eosinophil cationic protein) werden von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten exprimiert (Rosenberg, 1998; Sur et al., 1998) und zeigen Aktivität gegen das „Humane respiratorische Synzytial-Virus“ (Domachowske et al., 1998a, 1998b). Neben der viralen Aktivität besitzt die RNase 3 die Fähigkeit gramnegative und grampositive Bakterien zu hemmen (Rosenberg, 1995). EDN ist außerdem wie Defensine chemotaktisch aktiv und kann dendritische Zellen rekrutieren (Yang et al., 2003). Des Weiteren besitzen die RNase 5, 7 und 8 antimikrobielle Aktivität (Harder and Schroder, 2002; Hooper et al., 2003; Rudolph et al., 2006).

### **3.4.5 Histone**

Histone wurden 1884 von Albrecht Kossel entdeckt und repräsentieren damit eine der ersten beschriebenen Proteinfamilien. Im Zellkern spielen die Proteine dieser Familie eine essentielle Rolle in der Transkriptionsregulation (Parseghian and Luhrs, 2006). In den letzten Jahren wurden jedoch zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, in denen diverse Funktionen der Histone außerhalb des Zellkerns beschrieben wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Histone durch Migration vom Zellkern zu Mitochondrien an der Induktion von Apoptose beteiligt sind (Parseghian and Luhrs, 2006). Darüber hinaus wurden bereits Histone, Histon-Fragmente und Histon-ähnliche Proteine aus verschiedenen Organismen extrahiert und deren antimikrobielle Aktivität nachgewiesen (Kawasaki and Iwamuro, 2008). Rose *et al.* konnte das Histon H1 im Zytoplasma von humanen Villus Epithelzellen des Ileums lokalisieren und Aktivität des aus der Mukosa extrahierten Proteins gegen *Salmonella typhimurium* zeigen. Die Arbeitsgruppe hat die Hypothese aufgestellt, dass das Protein von Zellen, die sich vom Epithel ablösen und in die Apoptose eintreten, freigesetzt wird und dann die antimikrobielle Abwehr im Darmlumen unterstützt (Rose et al., 1998). In einer Studie von Howell *et al.* (Howell et al.,

2003) wurde Histon H1 und H2B aus Epithelzellen des Colons isoliert und Aktivität gegen *E. coli* gezeigt. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich 2009, bei einem Screening nach neuen antimikrobiellen Proteinen, die Histone H1 (H1b, H1d), sowie H2A und H2B in aus Colonmukosa extrahierten Fraktionen, die gegen *E.coli* K12 aktiv waren, nachweisen und damit die Aktivität dieser Proteine bestätigen (Küchler, 2009).

### **3.5 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen**

AMPs sind ein essentieller Bestandteil der intestinalen Barriere und verhindern eine Überwucherung mit kommensalen oder pathogenen Bakterien. Störungen in der Expression der AMPs können schwerwiegende Folgen haben und konnten unter anderem mit der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) assoziiert werden (Wehkamp et al., 2002; Jäger et al., 2010). CED lassen sich aufgrund verschiedener Charakteristika in die zwei Krankheitsbilder Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) unterteilen (Stange, 2004). Bei der CU handelt es sich um eine Entzündung, die sich vom Rectum kontinuierlich proximal ausbreitet und das gesamte Colon befallen kann. Histologisch lassen sich bei diesem Krankheitsbild oberflächliche, entzündungsinduzierte Veränderungen der Mukosa und Submukosa, wie zum Beispiel Kryptenabszesse, nachweisen (Khor et al., 2011). Bei MC beschränkt sich die Entzündung nicht nur auf das Colon, sondern kann den kompletten Gastrointestinaltrakt betreffen. Am häufigsten sind jedoch das terminale Ileum und die Perianalregion betroffen. Charakteristisch für dieses Krankheitsbild sind die sich nicht kontinuierlich ausbreitende Entzündung sowie auftretende Stenosen, Abszesse und Fisteln. Außerdem kommt es häufig zu Verdickungen der Submukosa sowie Organwand-durchdringenden Entzündungen (Khor et al., 2011).

Um den Grad der Entzündung in den CED-Patienten festzustellen, werden verschiedene Krankheitszeichen, wie die Anzahl der Stuhlgänge, die Intensität von Bauchschmerzen und weitere Parameter erhoben und daraus verschiedene Aktivitätsindices, beispielsweise der Crohn's disease activity index (CDAI), berechnet. Ein hoher CDAI mit einem Wert von über 150 ist ein Zeichen dafür, dass eine starke Entzündung vorliegt (Best et al., 1976; Thia et al., 2011). Bei ungefähr 5 % der Patienten ist aufgrund von nicht eindeutigen pathologischen Merkmalen die Zuordnung zu CU bzw. MC schwierig. In diesen Fällen bezeichnet man das Krankheitsbild mit dem Fachbegriff „Colitis indeterminata“ (Odze, 2003).

Obwohl sich zahlreiche Forschungsgruppen intensiv mit diesen Krankheiten befassen und immer mehr Faktoren identifiziert werden die mit der Entstehung von CED in Verbindung stehen, konnte die Ätiologie von CU und MC noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Lange Zeit hat man angenommen, dass CED durch Dysregulationen von spezifischen Abwehrmechanismen verursacht werden und es sich um Autoimmunerkrankungen handeln könnte (Thayer, 1976; Snook, 1990). Mittlerweile geht man davon aus, dass sowohl das Immunsystem, als auch genetische Faktoren und die Umwelt, wie zum Beispiel die Darmflora, eine entscheidende Rolle in der Entstehung der CED spielen (Wehkamp et al., 2008; Hill and Artis, 2010). Im Folgenden werden exemplarisch einige mit diesen Krankheitsbildern assoziierte Faktoren vorgestellt.

Bei der CU konnten diverse Veränderungen des Mukus festgestellt werden. Patienten, die an dieser Krankheit leiden, besitzen eine reduzierte Anzahl an Mukus-produzierenden Becherzellen. Dies hat zur Folge, dass die Mukusschicht deutlich dünner ist und damit den Epithelzellen einen verminderten Schutz bietet (Strugala et al., 2008). Darüber hinaus konnten qualitative Veränderungen der Muzine, wie zum Beispiel Modifikationen der Oligosaccharidseitenketten oder die Länge der Oligosaccharide, identifiziert werden, die sich wahrscheinlich negativ auf die Viskosität des Mukus und die Interaktionen mit Mikroorganismen und AMPs auswirken (Shirazi et al., 2000).

Mit der Entstehung des MC konnten bereits einige Faktoren, wie zum Beispiel verminderte Expression von AMPs, assoziiert werden. Wie bereits im Kapitel 3.4 über AMPs beschrieben, werden die beiden  $\alpha$ -Defensine HD-5 und -6 von den Panethzellen der Dünndarmkrypten exprimiert. Für die Induktion der Sekretion beider Defensine durch Mikroorganismen scheinen die NOD-2 Rezeptoren eine essentielle Rolle zu spielen. Eine Mutation in diesem Rezeptor konnte mit reduzierten HD-5 und -6 Level in Verbindung gebracht werden (Wehkamp et al., 2004, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei MC-Patienten die Prozessierung von HD-5 aus seinem Vorläufer durch Trypsin und andere Proteasen Störungen aufweist und dadurch eventuell weniger funktionsfähiges Peptid gebildet wird (Elphick et al., 2008). Kommt es zu Störungen in der Panethzelldifferenzierung, die einen Einfluss auf die Anzahl der Zellen oder deren Verteilung haben, kann dadurch ebenfalls die Sekretion von AMPs stark beeinträchtigt werden. Der Transkriptionsfaktor „T-cell factor 4“ (TCF-4, auch bekannt als TCF7L2) spielt eine wichtige Rolle in dem für die Differenzierung der Panethzelle essentiellen Wnt-Signalweg. In Patienten mit MC des Ileums konnte eine reduzierte TCF-4 Expression nachgewiesen werden, die wahrscheinlich einen negativen

Einfluss auf die Panethzellendifferenzierung sowie die HD-5 und -6 Expression hat (Wehkamp et al., 2007).

### **3.6 High-mobility group Superfamilie**

Die Mitglieder der High-mobility group (HMG) Superfamilie lassen sich aufgrund von strukturellen Eigenschaften und Funktionen in die drei Familien HMG-AT-Hook (HMGA), HMG-Box (HMGB) und HMG-nucleosome binding (HMGN) unterteilen (Bianchi and Agresti, 2005; Hock et al., 2007; Zhang and Wang, 2010). Vor knapp 40 Jahren wurde diese Superfamilie von Goodwin *et al.* erstmals beschrieben (Goodwin et al., 1973). Die Arbeitsgruppe konnte die Proteine in Säure-extrahierten Chromatin-Fraktionen, die aus Kälberthymus gewonnen wurden und sich durch hohe Beweglichkeit in der Gelelektrophorese auszeichneten, nachweisen. HMG-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Chromatin- und Transkriptionsregulation (Zhang and Wang, 2010). Im Folgenden werden weitere Funktionen und Eigenschaften verschiedener HMG-Proteine näher beschrieben.

#### **3.6.1 HMGA**

Für Proteine der HMGA-Familie ist eine Sequenz, die „AT-Hook“ bezeichnet wird und aus neun Aminosäuren (AS) besteht, mit denen AT-reiche Abschnitte in der kleinen Furche der DNA gebunden werden können, charakteristisch (Bianchi and Agresti, 2005). Bis heute konnten drei Mitglieder dieser Familie identifiziert werden, HMGA1a, HMGA1b und HMGA2 (Zhang and Wang, 2010). HMGA-Proteine werden in embryonalen Zellen stark exprimiert und spielen in der Embryonalentwicklung wahrscheinlich eine wichtige Rolle. In humanen Geweben von Erwachsenen kommen sie nur noch in geringen Mengen vor, werden jedoch in verschiedenen Tumoren stark exprimiert (Zhang and Wang, 2010).

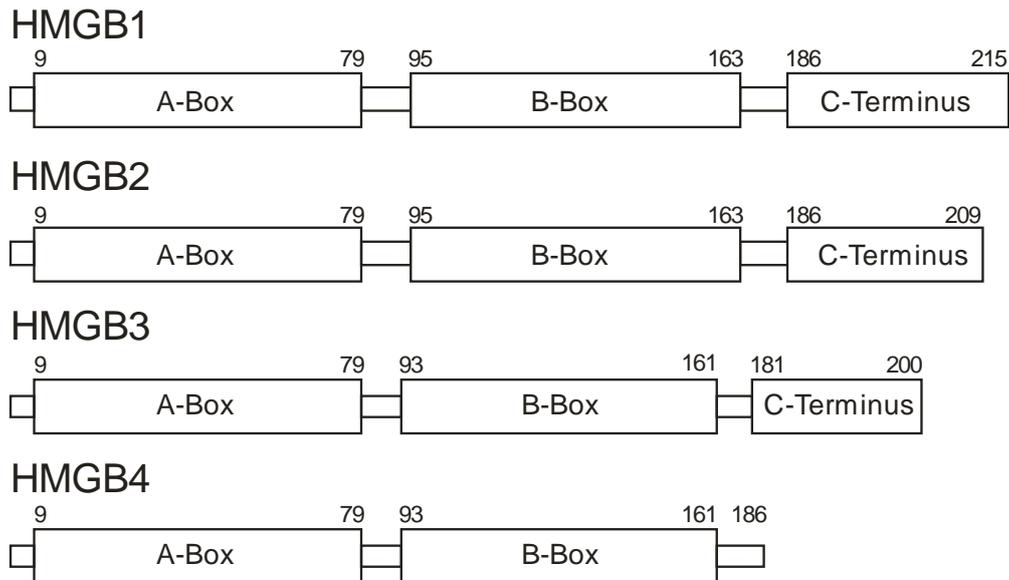
#### **3.6.2 HMGN**

HMGN-Proteine besitzen eine Nukleosomen-Bindedomäne und sind in der Lage innerhalb der Nukleosomen, zwischen den Histonen, die DNA zu binden (Bianchi and Agresti, 2005; Zhang and Wang, 2010). Die wichtigsten Vertreter der HMGN-Proteinfamilie sind HMGN1 und HMGN2. Darüber hinaus enthält die Familie die Proteine NSBP1, HMGN4 und HMGN3a/b (Hock et al., 2007). HMGN1 und 2 werden in allen Vertebraten exprimiert. Mit

Hilfe von Mausmodellen wurde nachgewiesen, dass die Proteine in der Embryonalentwicklung stark exprimiert werden und wahrscheinlich wichtig für die Differenzierung sind (Hock et al., 2007; Zhang and Wang, 2010). Neben den essentiellen Funktionen im Zellkern konnte gezeigt werden, dass HMGN2 antimikrobielle Aktivität besitzt (Feng et al., 2005a, 2005b; Ming et al., 2007).

### **3.6.3 HMGB**

Charakteristisch für die Proteine der HMGB-Familie sind die HMG-Box Domänen. Diese ungefähr 80 AS langen Domänen sind in ihrer Struktur sehr ähnlich und bestehen aus drei  $\alpha$ -Helices, die sich zu einer L-förmigen Struktur falten mit der die kleine Furche der DNA gebunden werden kann (Thomas and Travers, 2001). Die Familie der HMGB-Proteine umfasst die Mitglieder HMGB1 (früher HMG-1), HMGB2 (früher HMG-2) und HMGB3 (früher HMG-2a). Die Proteine besitzen zwei HMG-Boxen und einen stark sauren C-Terminus (Bustin, 2001; Hock et al., 2007; Zhang and Wang, 2010). Im Jahr 2009 wurde mit HMGB4 ein viertes Mitglied dieser Familie in Mäusen identifiziert. Das Protein besitzt ebenfalls zwei HMG-Boxen, jedoch keinen sauren C-Terminus (Catena et al., 2009). In Abbildung 1 sind die Proteine HMGB1-4 schematisch dargestellt. HMGB-Proteine sind bekannt für ihre wichtigen Funktionen im Zellkern, indem sie an verschiedenen Prozessen, wie der Replikation, Reparaturprozessen der DNA sowie Regulation der Transkription beteiligt sind (Bianchi and Agresti, 2005). Die Transkription kann durch drei verschiedene Mechanismen reguliert werden. HMGB-Proteine können mit „generellen“ Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel dem TATA-Box-Bindeprotein interagieren und damit einen Einfluss auf die Transkription ausüben (Das and Scovell, 2001). Darüber hinaus können sie mit spezifischen Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B, den HOX- und POU-Proteinen, p53 und p73 in Wechselwirkung treten (Agresti and Bianchi, 2003). Neben den Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren können die HMGB-Proteine mit Nukleosomen interagieren und dadurch die Bindung zu der DNA lockern. Dies erleichtert den Transkriptionsfaktoren und Chromatin-Remodelling-Komplexen den Zugang zur DNA (Agresti and Bianchi, 2003; Travers, 2003). Da HMGB1 das am intensivsten untersuchte Protein dieser Familie darstellt und HMGB2 Hauptbestandteil dieser Arbeit ist, wird im Folgenden auf diese beiden Proteine genauer eingegangen.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Struktur des HMGB1-HMGB4. Die Positionen der HMG-Boxen A und B sowie die der C-Termini wurden der UniProt-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>, HMGB1 (P09429), HMGB2 (P26583), HMGB3 (O15347), HMGB4 (Q8WW32)) entnommen.

### 3.6.3.1 HMGB1

HMGB1 ist ein ubiquitär exprimiertes, hoch konserviertes Protein der Eukaryoten, das in der AS-Sequenz zwischen Nagetieren und dem Menschen zu 99 % identisch ist (Wang et al., 2004). Die Expression von HMGB1 konnte durch Westernblots in verschiedenen Zelltypen der adulten Maus nachgewiesen werden (Ronfani et al., 2001). Der Knock-out von HMGB1 in einem Mausmodell hat gezeigt, dass die Mäuse nicht lebensfähig sind und aufgrund einer Hypoglykämie bereits innerhalb eines Tages sterben (Calogero et al., 1999). Neben den essentiellen Aufgaben im Zellkern konnten mittlerweile zahlreiche Funktionen des HMGB1 im Zytoplasma sowie außerhalb der Zelle nachgewiesen werden. In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Studien veröffentlicht, in denen essentielle Funktionen von HMGB1 in Entzündungsreaktionen gezeigt und ein Zusammenhang zwischen dem Protein und Sepsis nachgewiesen werden konnte (Wang et al., 1999; Yang and Tracey, 2010). Neben der ursprünglich beschriebenen Lokalisation im Nukleus wurde HMGB1, sowohl im Zytoplasma als auch extrazellulär detektiert. Das Protein kann passiv von nekrotischen oder geschädigten Zellen freigesetzt werden und Immunzellen, die sich in der Umgebung befinden, aktivieren und dadurch die Information des Zellschadens an diese übermitteln (Scaffidi et al., 2002; Yang et al., 2010). Im Gegensatz zu nekrotischen Zellen wird HMGB1 von apoptotischen Zellen nicht freigesetzt und induziert damit auch keine Immunantwort (Scaffidi et al., 2002). In gesunden Probanden ist das Protein nur in geringen Konzentrationen (10-

30 ng/ml) im Serum nachweisbar, kann jedoch durch Verletzungen des Gewebes stark ansteigen und dann von diversen Rezeptoren (Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), TLR2, TLR4, und TLR9) der Zelloberfläche wahrgenommen werden. Die Detektion des Proteins löst verschiedene intrazelluläre Signalwege aus, die unter anderem zum Ausbruch von Fieber und akuten Entzündungen führen (Yang and Tracey, 2010). Neben der passiven Freisetzung haben einige Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen, die Fähigkeit entwickelt HMGB1 aktiv zu sekretieren (Wang et al., 1999). In Zellkulturversuchen mit Makrophagen wurde gezeigt, dass diese durch Stimulation mit LPS, Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aktiviert werden können und daraufhin HMGB1 freisetzen. HMGB1 ist nach der Stimulation mit einer Verzögerung von 8 Stunden im Überstand detektierbar (Wang et al., 1999). In Mäusen konnte dieses Phänomen bestätigt werden. Das Serumlevel von HMGB1 war 8 bis 32 Stunden nach einer Behandlung mit LPS stark erhöht (Wang et al., 1999). Im Gegensatz zu anderen Faktoren, wie TNF- $\alpha$ , die während einer Sepsis gebildet werden und die Entzündung fördern handelt es sich beim HMGB1 um einen Faktor der erst spät freigesetzt wird (Wang et al., 2001). Die direkte Injektion von HMGB1 führte zum Tod der Mäuse, konnte jedoch durch eine Verabreichung von HMGB1-Antikörper verhindert werden (Wang et al., 1999). Das Protein scheint nicht nur bei der Sepsis in Mäusen eine Rolle zu spielen. Die Arbeitsgruppe konnte in derselben Studie zeigen, dass HMGB1 bei Patienten mit einer Sepsis im Serum signifikant erhöht ist. Die höchsten Proteinwerte wurden in Patienten gemessen, die an den Folgen einer Sepsis gestorben sind. Diese Studie und weitere Publikationen legen nahe, dass HMGB1 wahrscheinlich eine zentrale Rolle in der Sepsis einnimmt und ein mögliches therapeutisches Ziel darstellen könnte. Neben der Sepsis konnte HMGB1 mit weiteren Erkrankungen und Entzündungen assoziiert werden (Yang and Tracey, 2010). Unter anderem wurde das Protein bereits mit Pankreatitis und rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht und konnte bei Patienten, die unter diesen Erkrankungen litten, mit erhöhter Proteinkonzentration nachgewiesen werden (Taniguchi et al., 2003; Kocsis et al., 2009). Des Weiteren konnte HMGB1 in Mäusen mit Störungen der Barriere-Funktion im Ileum, wie einer erhöhten Permeabilität der Mukosa sowie mit einer Translokation von Bakterien zu mesenchymalen Lymphknoten, assoziiert werden. Die Verabreichung eines HMGB1- Antikörpers war in der Lage eine LPS-induzierte Störung der Barriere-Funktion in Ratten rückgängig zu machen (Yang et al., 2009). Bei Mäusen, in denen eine Colitis durch DSS (Dextran sulfate sodium

salt) induziert wurde, führte die Verabreichung von HMGB1- Antikörper zu einer reduzierten Entzündung und einer geringeren Tumorfrequenz (Maeda et al., 2007).

Der genaue Mechanismus der HMGB1 Sekretion ist noch nicht vollständig bekannt. Es konnten jedoch einige Daten zur Sekretion in Zellkulturversuchen mit humanen Zellen und Mauszellen gesammelt werden. Da HMGB1 keine Sequenz besitzt, die es für eine Sekretion über den Golgi/ER-Signalweg kennzeichnet, erfolgt diese über einen anderen Mechanismus. Die erste Phase der Sekretion in Monozyten wird durch ein Entzündungssignal wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder LPS eingeleitet und führt zu Acetylierungen von spezifischen Lysinen im Protein. Normalerweise kann sich HMGB1 durch aktiven und passiven Transport zwischen Nukleus und Zytoplasma bewegen. Durch die Acetylierungen wird der Übertritt vom Zytoplasma zum Nukleus inhibiert, wodurch das Protein im Zytoplasma akkumuliert. In den Monozyten nehmen sekretorischen Endolysosomen HMGB1 auf und können anschließend durch ein zweites Signal, wie Lysophosphatidylcholin (LPC), mit der Zellmembran fusionieren und dadurch das HMGB1 freisetzen (Gardella et al., 2002; Bonaldi et al., 2003).

Im Jahr 2002 konnte von Zetterström *et al.* antimikrobielle Aktivität des HMGB1 nachgewiesen werden. Das Protein wurde aus humanem und murinem Hodengewebe, sowie Adenoiden (Hypertrophien der Rachenmandel) isoliert und zeigte Aktivität gegen *Bacillus megaterium*, *Moraxella catarrhalis* sowie *E. coli* (Zetterström et al., 2002, 2006). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte ich in meiner Diplomarbeit antimikrobiell aktives HMGB1 aus humaner Colonmukosa extrahieren (Küchler, 2009). Gong *et al.* hat 2009 gezeigt, dass für die antimikrobielle Aktivität von HMGB1 fünf AS des C-Terminus essentiell sind (Gong et al., 2009).

Eine weitere interessante Beobachtung wurde erst vor kurzem von Vitali *et al.* gemacht. Die Arbeitsgruppe konnte HMGB1 im Stuhl von Patienten mit CED nachweisen, im Stuhl von Kontrollproben wurde das Protein nicht detektiert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass HMGB1 von Zellen im entzündeten Epithel sekretiert werden kann. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse wurde HMGB1 als neuer Marker zum Nachweis von Entzündungen im Darm vorgeschlagen (Vitali et al., 2011).

### **3.6.3.2 HMGB2**

Im Vergleich zu HMGB1 gibt es nur wenige Studien, die die Funktionen und Aufgaben von HMGB2 untersucht haben. In den meisten Publikationen beziehen sich die Expressionsdaten des Proteins auf Daten aus Mausmodellen, die von der Arbeitsgruppe um Bianchi im Jahr

2001 veröffentlicht wurden (Ronfani et al., 2001). Laut der Studie wird HMGB2 während der Embryogenese in vielen verschiedenen Zellen der Maus stark exprimiert. In adulten Mäusen ist die Proteinexpression jedoch auf wenige Zelltypen beschränkt. Mit Hilfe von Westernblots konnte das Protein in Hoden- und Thymusgewebe mit starkem Signal, in Milz und Lunge mit schwachem und in Gehirn, Leber, Niere, Herz sowie Uterus nicht bzw. nur in kleinsten Mengen detektiert werden. Leider wurde in dieser Arbeit kein Gewebe aus dem Gastrointestinaltrakt untersucht. In der Veröffentlichung wurde gezeigt, dass HMGB2 Knock-out Mäuse, im Gegensatz zu HMGB1 Knock-out Mäusen, lebensfähig sind. Es konnte jedoch eine reduzierte Fertilität der männlichen Mäuse nachgewiesen werden, die auf Degenerationen der Sertoli- und Keimzellen zurückzuführen ist. Neben dieser wichtigen Rolle bei der Spermatogenese in Mäusen wurden in den letzten Jahren weitere Funktionen des HMGB2 beschrieben. Laut einer Studie von 2010 ist HMGB2 wichtig für die Bildung von Erythrozyten. Das Protein kann an den Promotor des für deren Differenzierung essentiellen Transkriptionsfaktors Gfi-1B *in vivo* binden und durch Rekrutierung von weiteren Faktoren die Transkription aktivieren. Der Knock-out von HMGB2 führte in hämatopoetischen Vorläuferzellen zu einer reduzierten Gfi-1B-Expression und einer gestörten Erythrozyten-Differenzierung (Laurent et al., 2010). Darüber hinaus wurde 2009 gezeigt, dass die altersbedingte abnehmende Expression von HMGB2 im humanen und murinen Gelenkknorpel mit der Entstehung von Arthritis korreliert werden kann (Taniguchi et al., 2009). Dieser Zusammenhang konnte durch ein Mausmodell bekräftigt werden. Wie bei der Erythrozyten-Differenzierung spielt die Eigenschaft von HMGB2, die Transkription von bestimmten Genen regulieren zu können, auch in diesem Fall eine entscheidende Rolle. Durch die spezifische Expression von HMGB2 in Zellen eines Gelenkknorpelbereichs, der superfiziellen Zone, trägt das Protein zur Erhaltung der Chondrozyten bei, indem es die Expression von weiteren Faktoren mit reguliert. Die Abnahme der HMGB2-Expression im Verlauf des Alterungsprozesses führt wahrscheinlich zum Absterben von Chondrozyten in der superfiziellen Zone und ist damit an der Entstehung von Arthritis beteiligt. In verschiedenen Tumoren, wie zum Beispiel Glioblastomen und hepatozellulären Karzinomen, konnte eine erhöhte Expression von HMGB2 nachgewiesen werden (Balani et al., 2009; Kwon et al., 2010). Im hepatozellulären Karzinom konnte eine signifikant erhöhte Expression auf mRNA- und Proteinlevel detektiert werden. Je höher die Expression, desto schlechter war die Prognose für das Überleben der Patienten. Pusterla *et al.* hat 2009 eine Arbeit veröffentlicht, in der die Sekretion von HMGB2 aus myeloiden Zellen beschrieben wurde (Pusterla et al.,

2009). Die humane THP-1-Zelllinie war in der Lage, nach Stimulation mit LPS, HMGB2 zu sekretieren. Darüber hinaus konnte in derselben Studie gezeigt werden, dass HMGB2 wie HMGB1 mitogene sowie chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen der Rinderaorta (bovine aortic endothelial cells, BAEC) besitzt.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich 2009 eine neue Funktion des HMGB2-Proteins nachweisen (Küchler, 2009). Bei der Suche nach neuen antimikrobiellen Proteinen im Gastrointestinaltrakt konnte HMGB2 in einer gegen *E. coli* K12 aktiven Fraktion, die aus der Mukosa des Colons extrahiert wurde, identifiziert und damit gezeigt werden, dass HMGB2 antimikrobielle Aktivität besitzt.

### **3.7 Ziele der Arbeit**

In meiner Diplomarbeit konnte ich erstmals antimikrobielle Aktivität des HMGB2-Proteins nachweisen. Das Ziel dieser Doktorarbeit ist, die neue Funktion des Proteins genauer zu charakterisieren. Das aus dem Gewebe extrahierte HMGB2 zeigte antimikrobielle Aktivität gegen den Laborstamm *E. coli* K12. In weiteren Versuchen soll das Aktivitätsspektrum des Proteins gegen kommensale Bakterien untersucht werden. Die Abschnitte des Gastrointestinaltraktes zeichnen sich durch Unterschiede der Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel Variationen im pH-Wert oder der Konzentration des verfügbaren Sauerstoffs, aus. Da das Milieu einen großen Einfluss auf die Funktion von Proteinen haben kann, wird des Weiteren der Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität von HMGB2 untersucht. Eventuell lassen sich dadurch Rückschlüsse auf die Aktivität des Proteins im Gastrointestinaltrakt ziehen. Darüber hinaus soll die Frage beantwortet werden, ob HMGB2 bakteriostatische oder bakterizide Eigenschaften besitzt. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Analysen werden mit HMGB2 behandelte Bakterien auf Schäden untersucht, die auf eine bakterizide Wirkung schließen lassen. Damit genügend Protein für diese Versuche zur Verfügung steht, wird zu Beginn der Arbeit das Protein rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Bei vielen antimikrobiellen Proteinen ist es gelungen, die antimikrobielle Aktivität auf Bereiche des Proteins oder sogar kurze AS-Abschnitte einzugrenzen. Durch die separate rekombinante Expression von drei Peptiden, die verschiedenen Bereichen des HMGB2 entsprechen, soll untersucht werden ob die Aktivität einem bestimmten Abschnitt des Proteins zugeordnet werden kann. Da es nur sehr wenige Daten zu Expression des HMGB2 im Menschen gibt, wird zudem die mRNA- und

Proteinexpression im Gastrointestinaltrakt ermittelt. Dadurch können eventuell Rückschlüsse auf die Rolle des Proteins in der antimikrobiellen Abwehr gezogen werden. Die gestörte Expression von AMPs kann schwerwiegende Folgen für den Organismus haben und wurde bereits mit CED assoziiert. Durch die Analyse der HMGB2-Expression in CED- und Kontrollpatienten soll darüber hinaus untersucht werden ob ein Zusammenhang zwischen der HMGB2-Expression und CED hergestellt werden kann.

Zusammenfassend sollen folgende Fragen mit dieser Arbeit beantwortet werden:

- Welche Bakterien umfasst das Wirkungsspektrum von HMGB2?
- Kann die antimikrobielle Aktivität durch Umgebungsbedingungen beeinflusst werden?
- Wirkt HMGB2 über einen bakteriziden oder bakterio-statischen Mechanismus?
- Welche Domänen von HMGB2 sind für die antimikrobielle Funktion des Proteins verantwortlich?
- Wie wird HMGB2 im Gastrointestinaltrakt exprimiert?
- Gibt es Unterschiede in der Expression von HMGB2 zwischen CED- und Kontrollpatienten?
- Kann das Protein im Stuhl von CED- und Kontrollpatienten detektiert werden?

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
ABI 3500 DX genetic Analyzer	Hitachi, Japan
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent, USA
Anaerobiertopf	Oxoid Limited, UK
Bio Logic LP	Biorad, USA
Biopsy Punch	Stiefel, Deutschland
CG-840 pH-Meter	Schott, Deutschland
Dampfsterilisator Varioklav Typ 500	Varioklav, Deutschland
FACSCalibur™ (Durchflusszytometer)	Becton Dickinson, USA
Fastblot B43	Biometra, Deutschland
Heizblock DB-2A	Techne, UK
HPLC 1200 Series	Agilent Technologies, USA
HPLC-Säule: HisTrap™ HP	GE Healthcare, USA
HPLC-Säule: Vydac 218TP C18 5μ	Grace Davison Discovery Science, USA
Las-1000	Fujifilm, Japan
Leica DM 4000 B	Leica Microsystems, Deutschland
LIBRA 120 Transmissionselektronenmikroskop	Carl Zeiss, Deutschland
LightCycler® 480	Roche Applied Science, Deutschland
Mikro-Dismembrator S	B. Braun Biotech International, Deutschland
Mikrotom Leica RM2255	Leica Microsystems, Deutschland
Mini Protean System, Tetra Cell Gelapparatur SDS-PAGE	Biorad, USA

NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, USA
Photometer: Novaspec II	GE Healthcare, USA
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Platten-Reader: Wallac Victor 1420	Perkin Elmer, USA
Scanner: Epson Perfection 3200 Photo	Epson, Japan
Schüttelapparat Modell 3014	GFL, Deutschland
Schüttler HT	Infors HT, Schweiz
Sonikator (Bandelin Sonopuls HD 200)	Bandelin, Deutschland
Stickstofftank	Messer, Deutschland
Thermocycler PTC-200	MJ Research, USA
Thermosupply, Power Pac Universal	Biorad, USA
Ultracut Microtome	Reichert, Australien
Vakuumzentrifuge (Pumpe: RC 6)	Vacuubrand, Deutschland
Vakuumzentrifuge (Kühlfalle: CT 02-50 SR)	Christ, Deutschland
Vakuumzentrifuge (Zentrifuge: RVC 2-25 CD plus)	Christ, Deutschland
Vortexer Reax top	Heidolph, Deutschland
Waage: XS 105 Dual range	Mettler Toledo, USA
Waage: Kern GS	Kern, Deutschland
Zangenschweissgerät (polystar 100 ge)	Rische und Herfurth, Deutschland
Zentrifuge (Sorvall Superspeed RC2-B)	Hormuth-Vetter, Deutschland
Zentrifuge 320 R	Hettich, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Deutschland

## 4.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Proteine und Standards

<b>Chemikalien, Reagenzien, Proteine und Standards</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, USA
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
30 % Acrylamid/Bis Lösung	BioRad, USA
Acetonitril (AcN)	Roth, Deutschland
Agarose low EEO	Applchem, Deutschland
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck, Deutschland
Amoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deutschland
AMV- reverse Transkriptase	Promega, USA
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deutschland
Coomassie Brilliantblau R-250	Merck, Deutschland
Dampfgerer-Puffer pH 9,0 (S2367)	Dako, Dänemark
DIBAC4(3)	Invitrogen Eugene, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Deutschland
dNTPs (10 mM)	Promega, USA
DraI-HF	New England Biolabs, USA

Dye-Reagent-Konzentrat (Bio-Rad Protein-Assay)	Bio-Rad, Deutschland
Eindeckmedium: DePeX GurrR	VWR International, USA
Endogene Peroxidase Blocking-Solution (S2023)	Dako, Dänemark
Essigsäure, 100 %, wasserfrei	Merck, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
Ethidiumbromidlösung (0,025 %)	Roth, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Schweiz
FACS-Flow™	Becton Dickinson, Belgien
Glycerol (99 %)	Sigma, USA
Glycin	Serva Electrophoresis, Deutschland
Hämatoxylin	Merck, Deutschland
Harnstoff (Urea)	Promega, USA
HindIII-HF	New England Biolabs, USA
HMGB2 Antikörper (Hase, ab11973)	Abcam, England
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Deutschland
Human Beta Defensin 3 (hBD-3)	PeptaNova, Deutschland
Imidazol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Isopropanol	Roth, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Appllichem, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Schweiz
Kanamycin	Roth, Deutschland
Kupfer(II)-Sulfat	Sigma-Aldrich, USA
Luria Agar	Sigma-Aldrich, Deutschland

Luria Broth	Sigma-Aldrich, Deutschland
Lysozym (Huhn)	Sigma, Deutschland
Magermilchpulver	Fluka Analytik, Deutschland
Methanol	Merck, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Qiagen, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Merck, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Deutschland
Natriumiodat	Merck, Deutschland
NEB-Puffer 2	New England Biolabs, USA
Neoclear	Merck, Deutschland
PCR-Puffer (10x)	Qiagen, Deutschland
Ponceau-Lösung (Ponceau S)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Kaleidoscope Standard	Biorad, USA
Q-Solution	Qiagen, Deutschland
Restore <sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, USA
Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Saccharose	Roth, Deutschland
Salzsäure (Hydrogenchlorid, HCl)	Roth, Deutschland
Schädler-Medium	Becton Dickinson, USA
Sek. Antikörper (HMGB2) (111-035-003)	Jackson ImmunoResearch, USA

Sek. Antikörper ( $\beta$ -Actin) (115-035-003)	Jackson Immunoresearch, USA
Serva Blue G	Serva Electrophoresis, Deutschland
SOC-Medium	Invitrogen, USA
SUMO-Protease 2	Life Sensors, USA
Super Signal <sup>R</sup> West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, USA
SYBR Green I	Roche Applied Science, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tris	Roth, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Deutschland
Triton X-100	Serva Electrophoresis, Deutschland
Trizol Reagenz	Ambion, England
Tryptic Soy Broth (TSB)	Becton Dickinson, USA
Tween 20	Fluka Analytik, Deutschland
Tween 80	Merck, Deutschland
X-Gal	Roth, Deutschland
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Zitronensäure	Fluka, Schweiz
$\beta$ -Actin Antikörper (Maus, A54441)	Sigma-Aldrich, Deutschland

### 4.1.3 Kits

<b>Kits</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Agilent RNA 600 nano Kit	Agilent, USA
Big Dye Terminator V.1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Deutschland
Champion™ pET SUMO Protein Expression System	Invitrogen, USA
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako, Dänemark
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, USA

### 4.1.4 Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
50 ml Reaktionsröhrchen (Centrifuge Tube)	Corning Incorporated, Mexico
Anaero Gen™ Beutel	Oxoid Limited, England
Anaerobier Indikator	Oxoid Limited, England
Columbia Blutagar Platten	Becton Dickinson, USA
Deckglas	R. Langenbrinck, Deutschland
Dialyseschlauch (Cellu Sep T1)	Membrane Filtration Products, USA
Eppendorfgefäße (1,5 und 2 ml, Safe-Look Tubes)	Eppendorf, Deutschland
Filterpapier (Gel Blot Paper)	Roth, Deutschland
Mikrotiterplatte (96-Well, Polypropylen)	Greiner Bio-One, Österreich
Mikrotiterplatte für LC-480 (96-Well)	Roche Applied Science, Deutschland
Multiflex Round Tips	Sorenson, USA

Objektträger	R. Langenbrinck, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One, Deutschland
Pipettenspitzen: epT.I.P.S verschiedene Größen	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen: Multiguard, Barrier Tips verschiedene Größen	Sorenson, USA
Pistill	Roth, Deutschland
Protran – Whatman Membran	GE Healthcare, UK
Skalpell	Feather Safety Razor Co, Japan
Spritze	B. Braun, Deutschland
Universal-Indikatorpapier	Macherey-Nagel, Deutschland

#### **4.1.5 Programme**

<b>Programm</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Aida Image Analyzer V. 4.19	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Deutschland
Cell Quest Software	Becton Dickinson, USA
Geneious pro V.4.8.5	Biomatters Ltd, Neuseeland
Image Reader Las-1000 Pro V. 2.6	Fujifilm, Japan
Leica Application Suite V4	Leica Microsystems, Deutschland
Light Cyclor Software V.3.5	Roche, Schweiz

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Bakterienstämme

Es wurden folgende Bakterienstämme verwendet: *Escherichia coli* K12, *Bifidobacterium adolescentis* Ni3,29c (klinisches Isolat), *Bifidobacterium breve* PZ 1343 (vom probiotischen VSL#3), *Lactobacillus acidophilus* PZ 1130 (klinisches Isolat), *Lactobacillus fermentum* PZ 1162 (klinisches Isolat), *Bacteroides vulgatus* DSM1447 (von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)), *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* DSM20617 (DSMZ), *Bifidobacterium longum* DSM20219 (DSMZ), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 wurde von dem Institut für Labormedizin der Klinik am Eichert in Göppingen bereitgestellt, alle anderen Stämme wurden von der Firma Ardeypharm aus Herdecke zur Verfügung gestellt.

### 4.2.2 Biologisches Material

Humane Biopsien wurden während medizinisch indizierten Endoskopien aus verschiedenen Bereichen des Darms bzw. des Magens am Robert-Bosch-Krankenhaus (Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Chefarzt Prof. Dr. Eduard F. Stange) in Stuttgart entnommen. Die Patienten erteilten vor dem Eingriff ihr schriftliches Einverständnis und wurden über mögliche Risiken und Hintergründe der Studie informiert. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor. Die Biopsien wurden umgehend in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Das für den Westernblot verwendete Gewebe wurde ebenfalls am Robert-Bosch-Krankenhaus (Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie mit Schwerpunkt Tumor- und minimal-invasive Chirurgie, Chefarzt Prof. Dr. Wolfgang Steurer) bei der Entfernung von Tumoren entnommen. Das Gewebe stammte nicht direkt aus dem Tumor, sondern aus der nahen Umgebung. Für die Verwendung des Gewebes lagen ein positives Ethikvotum und das schriftliche Einverständnis der Patienten vor. Nach dem Eingriff wurde das Gewebe in eisgekühlte Plastikbecher überführt, die Mukosa umgehend mit Hilfe eines Skalpells vom Rest des Gewebes getrennt und in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt. Nach dem Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff wurden diese bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Entnahme der Stuhlproben erfolgte ebenfalls am Robert-Bosch-Krankenhaus (Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Chefarzt

Prof. Dr. Eduard F. Stange) mit dem Einverständnis der Patienten und einem positiven Ethikvotum. Das Probenmaterial wurde in 50 ml Reaktionsröhrchen bei -20 °C gelagert.

### **4.2.3 Aufarbeitung der Gewebeproben für Proteinanalysen**

Das Gewebe wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilt und mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das Gewebe wurde anschließend mit einer teflonbeschichteten Stahlkugel in ein verschließbares Teflongefäß überführt und mit einer Frequenz von 2000 rpm für 40 s in einem Mikro-Dismembrator geschüttelt. Um ein Auftauen des Gewebes zu verhindern, musste die Stahlkugel und das Teflongefäß vor Gebrauch ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden. Die Kollisionen der Stahlkugel mit den Gewebestücken erzeugte ein homogenes Pulver, das mit einem Spatel in 2 ml Eppendorfgefäße überführt wurde. Durch Wiegen der Eppendorfgefäße wurde das Gewicht des Gewebepulvers ermittelt und für jedes Gramm Gewebe 3 ml Extraktionspuffer zugegeben (60 % (v/v) Acetonitril (AcN), 1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in H<sub>2</sub>O). Die Extraktion erfolgte über 90 min auf Eis. Der Extrakt wurde alle 20 min mit einem Vortex-Gerät geschüttelt um eine gute Durchmischung zu erzielen. Es folgte eine Zentrifugation bei 16.000 x g für 20 min und die Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß. Der Überstand wurde abschließend mit einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und das Sediment in 120 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Dazu wurde eine Standardreihe mit Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin, BSA) nach dem Pipettierschema der Tabelle Nr.1 erstellt. Es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur über 5 min und die Messung der Extinktion bei 595 nm. Anschließend wurden 2 µl der Probe mit Wasser auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und 200 µl Dye-Reagent-Konzentrat zugegeben. Nach einer Inkubation über 5 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und die Konzentration mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

BSA-Standardlösung: 1 µg BSA / µl in 0,01 %iger Essigsäure

Standard	H <sub>2</sub> O [μl]	BSA- Standardlösung [μl]	Dye-Reagent- Konzentrat [μl]
1	800	0	200
2	798	2	200
3	796	4	200
4	794	6	200
5	792	8	200
6	790	10	200
7	788	12	200
8	786	14	200
9	784	16	200
10	782	18	200

**Tabelle 1** Pipettierschema zur Erstellung der Standardreihe der Bradford-Messung

#### 4.2.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Gelen handelt es sich um 12 %ige und 18 %ige Acrylamidgele. Nach dem Gießen und dem Aushärten der Gele wurden diese in die Laufapparatur eingebaut. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt (Probenpuffer 1 oder 2) und für 5 min im Heizblock bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Gels pipettiert. Nach dem Befüllen der Kammer mit Laufpuffer wurde eine Spannung von 100 V für 1,5 bis 2 h angelegt.

Acrylamidgele			
	12 % (v/v) Trenngel	18 % (v/v) Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	3,3 ml	1,2 ml	2,7 ml
30 % Acrylamid/ Bis Lösung	4,0 ml	6,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,6 ml	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	-	0,5 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
10 % (w/v) APS	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,010 ml	0,004 ml

**Tabelle 2** Zusammensetzung der Acrylamidgele

Probenpuffer 1 (2x)	
SDS	4 % (w/v)
Harnstoff	6 M
Glycerol	12 % (v/v)
Tris (pH 6,8)	50 mM
Serva Blue G	0,01 % (w/v)

**Tabelle 3** Zusammensetzung des Probenpuffer 1

Probenpuffer 2 (2x)	
SDS	4 % (w/v)
Harnstoff	6 M
Glycerol	12 % (v/v)
Tris (pH 6,8)	50 mM
Serva Blue G	0,01 % (w/v)
Dithiothreitol (DTT)	100 mM *

**Tabelle 4** Zusammensetzung des Probenpuffer 2

\* Bei der Angabe, dass erhöhte Mengen von reduzierenden Bestandteilen verwendet wurden, enthielt der Puffer 200 mM DTT.

Laufpuffer (10x)	
Glycin	1920 mM
Tris	250 mM
SDS	35 mM

**Tabelle 5** Zusammensetzung des Laufpuffers. Vor dem Lauf wurde der Puffer 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

### 4.2.5 Coomassie Färbung

Bei dieser Färbemethode werden die Proteine im Gel durch den Farbstoff Coomassie visualisiert. Da die Farbstoffmoleküle hauptsächlich mit den basischen und aromatischen AS interagieren, ist die Färbintensität von der AS-Zusammensetzung der anzufärbenden Proteine abhängig (Chevalier, 2010).

Um die Proteine mit Coomassie anzufärben wurden die Acrylamidgele nach dem Lauf in 20 ml Coomassie Färbelösung für 30 – 60 min auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach dem Abgießen der Färbelösung wurden die Gele 2 – 3 Mal mit 20 ml Entfärbelösung für 30 min gewaschen. Für eine optimale Dokumentation der Gele wurden diese mit 2 – 3 ml Wasser in eine Folie eingeschweißt und eingescannt.

Coomassie Färbelösung	
Coomassie R-250	0,05 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)

**Tabelle 6** Zusammensetzung der Coomassie Färbelösung

Coomassie Entfärbelösung	
Essigsäure	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)

**Tabelle 7** Zusammensetzung der Coomassie Entfärbelösung

#### 4.2.6 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bilden die Silberionen Komplexe mit den AS Glutamin, Asparagin und Cystein. Durch Zugabe von reduzierenden Agenzien werden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert und die Proteine färben sich im Acrylamidgel dunkel an. Wie bei der Coomassie Färbung ist die Intensität der Färbung von der AS-Zusammensetzung abhängig (Rehm, 2006).

Um die Proteine mit Silbernitrat anzufärben wurden die Gele nach der Auftrennung 4 Mal 10 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend 1 min in 100 ml 8 mM Natriumthiosulfat (in H<sub>2</sub>O) inkubiert. Es folgten 2 weitere Waschstschritte mit H<sub>2</sub>O für 2 min und die Färbung mit 100 ml 12 mM Silbernitrat (in H<sub>2</sub>O) für 30 min. Nach dem Abgießen des Silbernitrats wurde das Gel 1 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in eine frische Schale überführt. Es folgte die Zugabe von 100 ml Entwicklungslösung und eine Inkubation über 30 min. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 ml Stopplösung beendet. Für die Dokumentation wurden die Gele mit 2 - 3 ml H<sub>2</sub>O in eine Folie eingeschweißt und eingescannt.

Entwicklungslösung	
Glucose	2 % (w/v)
Borsäure	100 mM
Natriumhydroxid	150 mM
Natriumthiosulfat	50 µM

**Tabelle 8** Zusammensetzung der Entwicklungslösung

Stopplösung	
Essigsäure	2 % (v/v)
Tris-Base	330 mM

**Tabelle 9** Zusammensetzung der Stopplösung

#### 4.2.7 Westernblot

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der AS-Sequenz von HMGB1 und HMGB2 erwies sich die Suche nach einem HMGB2-spezifischen Antikörper als schwierig. Bei der Generierung der meisten verfügbaren HMGB2-Antikörper wurde den Antikörper-produzierenden Tieren das komplette HMGB2 injiziert. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der zwei HMGB-Proteine ist der auf diese Art produzierte Antikörper wahrscheinlich auch in der Lage, dass stark exprimierte HMGB1 zu erkennen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurde für die Immunisierung ein 16 AS-langes Immunogen injiziert, das den AS 166-181 des HMGB2 entspricht. Der Antikörper sollte aufgrund der Unterschiede der HMGB-Proteine in diesem Bereich spezifisch sein und wurde mittlerweile in verschiedenen Veröffentlichungen verwendet (zB. Yanai et al., 2009). Alle Westernblots wurden mit 12 %igen Acrylamidgelen durchgeführt. Nach dem Auftrennen der Proteine im Gel wurde dieses gewaschen. Sämtliche Waschschrte erfolgten mit 1x PBST (phosphate buffered saline (PBS)), mit 0,1 % (v/v) Tween 20 (PBST). Um eine gute Durchmischung und eine gleichmäßige Verteilung auf der Membran zu gewährleisten wurde für alle Waschschrte und Inkubationen ein Wippschüttler verwendet. Wenn nicht anders angegeben wurde 10 min inkubiert. Für das Semi-Dry-Blotten wurde ein Sandwich aus 3 Filterpapieren, Nitrocellulosemembran, Gel und 3 Filterpapieren erstellt. Alle Bestandteile des Sandwiches wurden zuvor in Transferpuffer eingelegt. Störende Luftblasen wurden mit Hilfe einer Walze aus dem Sandwich entfernt. Der Blottvorgang wurde mit einem „Fastblot B43“ System und einer Stromstärke von 350 mA für 17 min bei einer Membran und 400 mA für 17 min beim Blotten von zwei Membranen durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran gewaschen und eine Ponceaufärbung mit 20 ml Ponceau-Lösung durchgeführt. Die reversible Färbung diente der Kontrolle ob durch den Blottvorgang Proteine auf die Membran übertragen wurden. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen und dann 1 h bei Raumtemperatur mit 3 % (w/v) BSA in PBST geblockt. Nach einem weiteren Waschschrte wurde der HMGB2-Antikörper (Abcam ab11973) in 1 % (w/v) BSA (in PBST) mit einer Konzentration von 0,042 µg/ml zugegeben. Die Membran wurde mit der Antikörperlösung in einer Plastikfolie eingeschweißt und über

Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper abgenommen und die Membran 3 Mal 20 min gewaschen. Es folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (Ziege anti-Hase Meerrettich IgG Peroxidase-konjugiert) mit einer Verdünnung von 1:10000 in 1 % (w/v) Magermilchpulver (in PBST) und eine Inkubation über 1 h bei Raumtemperatur. Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran 6 Mal gewaschen. Für die Färbung wurde die Färbelösung „Super Signal<sup>R</sup> West Dura Extended Duration Substrate“ von Thermo Scientific verwendet. Die beiden Lösungen des Systems wurden nach Herstellerangaben gemischt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte über 5 min im Dunkeln. Für die Aufnahme der Bilder wurde ein gekühltes Kamerasystem (LAS-1000) verwendet. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der AIDA Software.

Für die Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Die Membran wurde dazu für 10 min mit PBST gewaschen und 30 min mit „Restore<sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer“ inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBST für jeweils 10 min und das Blocken mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (in PBST) für 1 h. Anschließend wurde der  $\beta$ -Actin Antikörper mit einer Verdünnung von 1:5000 in 2,5 % (w/v) Magermilchpulver (in PBST) auf die Membran gegeben und für 1 h inkubiert. Nach dem Abnehmen der Antikörperlösung wurde die Membran 3 Mal für 20 min mit PBST gewaschen und der sekundäre Antikörper (Ziege anti-Maus Meerrettich IgG Peroxidase-konjugiert) mit einer Verdünnung von 1:5000 in 2,5 % (w/v) Magermilchpulver (in PBST) zugegeben und für 1 h inkubiert. Die folgenden Schritte waren identisch mit dem Protokoll der HMGB2-Färbung nach Zugabe des sekundären Antikörpers.

Transferpuffer	
Tris-Base	29 g
Glycin	14,6 g
20 % (w/v) SDS (in H <sub>2</sub> O)	9,25 ml
Methanol	1 l
H <sub>2</sub> O	auf 5 l auffüllen

**Tabelle 10** Zusammensetzung des Transferpuffers

PBS (10x)	
Natriumchlorid (NaCl)	80 g
Kaliumchlorid (KCl)	2 g
Natriumhydrogenphosphat	14,4 g
Kaliumhydrogenphosphat	2 g

**Tabelle 11** Zusammensetzung des PBS

#### **4.2.8 Aufarbeitung von Stuhlproben und Dot blot**

Es wurden jeweils 3 Stuhlproben von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die sich in einer Entzündungsphase befanden (Crohn's disease activity index > 150 oder makroskopische Entzündung) und Kontrollen aufgearbeitet. Die Proben waren sehr unterschiedlich in Bezug auf ihre Konsistenz, Farbe und Geruch. Mit Hilfe eines Spatels wurden ungefähr 500 mg der Proben in 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Da die Proben teilweise sehr zäh waren und daher das Abwiegen von diesen schwierig war, variierte die Probenmenge leicht und reichte von 410 mg bis 580 mg. Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden jeder Probe pro mg Stuhl 3 µl Extraktionspuffer (60 % (v/v) AcN, 1 % (v/v) TFA in H<sub>2</sub>O) zugegeben. Es folgte eine Inkubation über 2 h auf Eis. Um eine gute Durchmischung der Extrakte zu erreichen wurden diese alle 20 min mit einem Vortex-Gerät geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 16000 x g für 20 min zentrifugiert, 1000 µl der Überstände in frische Eppendorfgefäße überführt und diese mit der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die Sedimente wurden dann in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bei dem Dot blot wurden je 1 µl eines Standard des rekombinant exprimierten HMGB2 (10 ng/µl, 50 ng/µl und 100 ng/µl) und 1 µl der Stuhlproben-Extrakte sowie 1 µl einer 1:10-Verdünnung (mit H<sub>2</sub>O) der Extrakte aufgetragen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation, um das Einziehen der Proben zu gewährleisten. Anschließend wurde die Membran für 10 min mit PBST auf einem Schüttler gewaschen. Die folgenden Schritte waren identisch mit denen des Westernblots nach der Ponceau-Färbung.

## 4.2.9 Rekombinante Expression von HMGB2, A-Box, B-Box und C-Terminus

Für die rekombinante Expression wurde das „Champion™ pET-SUMO Protein Expression System“ von Invitrogen verwendet. Bei diesem Vektorsystem wird das gewünschte Protein als Fusionsprotein mit einem His-Tag für die Aufreinigung und einer SUMO (small-ubiquitin-like modifier)-Sequenz exprimiert. Die SUMO-Sequenz sorgt für eine charakteristische Tertiärstruktur, die durch die SUMO-Protease erkannt und geschnitten wird. Da die Protease nicht wie viele andere Proteasen AS-Sequenzen sondern ausschließlich die SUMO-Tertiärstruktur erkennt und schneidet, kommt es nicht zu unerwünschten Schnitten im exprimierten Protein. Da sich die Schnittstelle N-Terminal direkt am Zielprotein befindet, erhält man nach dem Verdau ein natives Protein, das keine zusätzlichen AS besitzt. Die Nukleotidsequenz des zu exprimierenden Proteins wird zu Beginn durch eine TA-Klonierung in den pET-SUMO-Vektor eingebracht. In dem Vektor befindet sich das Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Der T7-Promotor und der Promotor der T7 RNA-Polymerase besitzen eine Bindestelle für den lac-Repressor. Bevor die Expression induziert wird, unterbindet der Repressor die Expression der T7 RNA-Polymerase und die des Zielgens. Durch die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird der Repressor verdrängt, die T7 RNA-Polymerase kann gebildet werden und im Anschluß das Zielgen transkribieren. Durch die strenge Unterdrückung der Expression können auch für die Bakterien stark toxische Proteine exprimiert werden, da diese erst durch IPTG-Zugabe induziert wird.

### 4.2.9.1 Klonierung

Für die ersten Expressionsversuche wurde die Nukleotidsequenz des humanen *HMGB2* (NM\_002129.3) aus cDNA amplifiziert und in den pET-SUMO-Vektor kloniert. Trotz der Verwendung von unterschiedlichen Expressionsbedingungen war es nicht möglich *HMGB2* im Bakterienlysat nachzuweisen. Da einige Codons von *HMGB2* aufgrund der seltenen Verwendung in *E.coli* für eine Expression nicht optimal sind, haben wir das Gen von MWG für die Codon-Usage von *E. coli* optimieren lassen und für alle weiteren Expressionen verwendet. Die Codon-optimierte Nukleotidsequenz wurde von MWG mit einer 5'-Schnittstelle für BamHI und einer 3'-Schnittstelle für HindIII ausgestattet, in den pCR2.1 Vektor kloniert und diente für alle Klonierungen in den pET-SUMO-Vektor als Grundlage.

Um die optimale Temperatur für die Primer zu ermitteln wurden Polymerase-Kettenreaktionen (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) bei 55 °C, 56 °C, 59 °C und 63 °C durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit den in Tabelle 13 angegebenen Primern. Die Effektivität der PCR wurde durch ein Gel (1 % (w/v) Agarose in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), 2 Tropfen 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid) überprüft, nachdem den PCR-Produkten die entsprechende Menge Probenpuffer zugegeben wurde. Die Ligation erfolgte über 45 min bei Raumtemperatur und setzte sich aus den in Tabelle 15 angegebenen Komponenten zusammen. Anschließend wurden 2 µl des Vektors in Mach1™-T1-Zellen transformiert und diese für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30 s Hitzeschock bei 42 °C, die Zugabe von 250 µl SOC (Super Optimal Broth)-Medium und eine 45 min Inkubation bei 37 °C. Abschließend wurden 50 µl bzw. 150 µl der transformierten Zellen auf LB-Kanamycin-Agaroseplatten ausplattiert und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Da der pET-SUMO-Vektor ein Resistenzgen für Kanamycin besitzt waren nur Zellen, die den Vektor aufgenommen hatten, in der Lage auf den Platten zu wachsen. Am nächsten Tag wurden einige der Kolonien gepickt und in jeweils 6 ml LB-Kanamycin-Medium überimpft. Nach einer über Nacht-Inkubation wurden die Zellen für 10 min bei 16000 x g abzentrifugiert. Die Extraktion der Vektor-DNA aus dem Sediment erfolgte mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die DNA wurde im letzten Schritt mit 30 µl EB-Puffer (HMGB2) bzw. 50 µl EB-Puffer (A-Box, B-Box oder C-Terminus) eluiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines NanoDrop Spektrophotometers. Da es sich bei dem pET-SUMO-Vektor um ein Low Copy Plasmid handelt, also sehr wenige Kopien pro Zelle enthalten sind, war die Ausbeute mit 1098 µg – 1632 µg bei HMGB2 bzw. 720 µg – 1360 µg bei A-Box, B-Box und C-Terminus sehr niedrig. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe eines Testverdaus überprüft ob die isolierten pET-SUMO-Vektoren das gewünschte Insert besitzen oder durch eine Religation keine DNA aufgenommen haben. Für den Verdau wurden die beiden Restriktionsenzyme DraI-HF und HindIII-HF verwendet. Der Verdau erfolgte über 1 h bei 37 °C und setzte sich aus den Komponenten der Tabelle 16 zusammen. Im Anschluss wurde der Verdau mit Probenpuffer gemischt und neben Größenstandards (100 bp DNA Ladder bzw. 1 kb Plus DNA Ladder) in einem Gel (1 % (w/v) Agarose in 1x TAE, 2 Tropfen 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid) aufgetrennt. Bei HMGB2 wurden 3 µl Bromphenolblau-Probenpuffer, bei A-Box, B-Box und C-Terminus je 5 µl Xylencyanol-Probenpuffer zugegeben. Die Bande des HMGB2 (222 bp Vektor + 630 bp HMGB2 = 852 bp) sowie die von A-Box (222 bp Vektor + 252 bp A-Box

Fragment = 474 bp), B-Box (222 bp Vektor + 285 bp B-Box Fragment = 507 bp) und C-Terminus (222 bp + 172 bp C-Terminus Fragment = 394 bp) konnten detektiert werden. Mit dem Verdau wurde überprüft ob der Vektor ein Insert enthält. Um sicherzustellen, dass die Orientierung des Inserts korrekt ist und die Sequenz keine Mutationen enthält wurde das Insert in beide Richtungen sequenziert.

TAE-Puffer	
Tris	242 g
Essigsäure	57 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
H <sub>2</sub> O	auf 1 l auffüllen

**Tabelle 12** Zusammensetzung des TAE-Puffers

	Vorwärts (5'-3')	Rückwärts (5'-3')
HMGB2	ATGGGGAAAGGCGACC	TTATTCTTCGTCCTCATCTTCTTCT
A-Box	ATGGGGAAAGGCGACCCG	TTAGTCCCCTTTCGGTGG AAC
B-Box	GGGGACAAGAAAGGCAAAA	TTACCGACCAGGACCTTTCTT
C-Terminus	GCAGGAAAGAAAGGTCCTG	AGTAACGGCCGCCAGTGT (bindet in Vektorsequenz)

**Tabelle 13** Verwendete Primer für die Klonierungen

PCR-Bedingungen HMGB2:

95 °C	15 min	
95 °C	30 s	} 39 Zyklen
59 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	20 min	

PCR-Bedingungen A-Box, B-Box, C-Terminus:

95 °C	15 min	
95 °C	60 s	} 40 Zyklen
55 °C	60 s	
72 °C	60 s	
72 °C	10 min	

HMGB2		A-Box, B-Box, C-Terminus	
DNA	2 µl	DNA	4 µl
PCR Puffer (10x) *	5 µl	Q-Solution	5 µl
dNTPs (50mM) *	0,5 µl	Puffer	2,5 µl
Primer	je 2 µl	dNTPs (10 mM)	1,25 µl
H <sub>2</sub> O	37,5 µl	MgCl <sub>2</sub>	1 µl
HotStarTaq	1 µl	Primer	je 1 µl
		H <sub>2</sub> O	9 µl
		HotStarTaq	0,25 µl

**Tabelle 14** Pipettierschema der Komponenten für die PCR

Die mit \* gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des „Champion™ pET-SUMO Protein Expression System“

	HMGB2	A-Box, B-Box, C-Terminus
PCR-Produkt	1 µl	3 µl
Ligationspuffer (10x) *	1 µl	1 µl
pET-SUMO Vektor *	2 µl	2 µl
H <sub>2</sub> O	5 µl	3 µl
T4 DNA Ligase *	1 µl	1 µl

**Tabelle 15** Pipettierschema der Ligationen in den pET-Sumo Vektor

Die mit \* gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des „Champion™ pET-SUMO Protein Expression System“

	HMGB2	A-Box, B-Box, C-Terminus
DNA	400 ng	400 ng
H <sub>2</sub> O	auf 15 µl aufgefüllt	auf 25 µl aufgefüllt
NEB-Puffer 2	2 µl	3 µl
DraI-HF	0,5 µl	1 µl
HindIII-HF	0,5 µl	1 µl

**Tabelle 16** Pipettierschema des Test-Verdaus

Bromphenolblau/ Xylencyanol- Probenpuffer (6 x)	
Saccharose	40 g
Bromphenolblau oder Xylencyanol	0,25 g
H <sub>2</sub> O	50 ml

**Tabelle 17** Zusammensetzung des Bromphenolblau/ Xylencyanol- Probenpuffers

LB-Kanamycin-Agaroseplatten	
Luria Agar	40 g
H <sub>2</sub> O	auf 1 l auffüllen
	autoklavieren und auf ca. 55 °C abkühlen lassen
Kanamycinlösung (50 mg Kanamycin / ml H <sub>2</sub> O)	1000 µl
	gießen des Mediums in Petrischalen

**Tabelle 18** Protokoll für die Erstellung der LB-Kanamycin-Agaroseplatten

LB-Kanamycin-Medium	
Luria Broth	20 µg
H <sub>2</sub> O	500 ml
Kanamycinlösung (50 mg Kanamycin / ml H <sub>2</sub> O)	500 µl

**Tabelle 19** Protokoll für die Erstellung des LB-Kanamycin-Mediums

#### 4.2.9.2 Transformation, Expression in BL21-Zellen und Lyse der Zellen

Nachdem die Sequenz des Inserts überprüft wurde konnte der Vektor in die Zellen für die Expression transformiert werden. Es gibt zahlreiche kommerziell verfügbare Expressionszellen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Bei Vorversuchen wurden verschiedene Expressionszellen getestet. Die besten Ergebnisse konnten mit BL21(DE3)-Zellen erzielt werden, daher wurden diese auch für die Hauptversuche verwendet. Für die Transformation wurden 2 µl (100 ng) Vektor-Insert DNA in ein Röhrchen mit BL21(DE3) pipettiert. Es folgten eine 30-minütige Inkubation auf Eis und ein 30 s Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 50 µl oder 100 µl der Zellsuspension auf LB-Kanamycin-Agaroseplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie gepickt und mit dieser 120 ml LB-Kanamycin-Medium angeimpft. Nach einer weiteren über Nacht Inkubation bei 37 °C wurden vier 1 l Kolben, die 600 ml LB-Medium enthielten, mit jeweils 30 ml der Übernachtkultur angeimpft. Nach 2 - 2,5 h wurde die optische Dichte (OD) der Kulturen bei 600 nm gegen LB-Kanamycin-Medium als Referenz gemessen. Wenn die OD 0,4 - 0,6 betrug und sich damit die Bakterien in der exponentiellen Phase (log-Phase) befanden, wurde durch Zugabe von 1 M IPTG eine IPTG Endkonzentration von 1 mM eingestellt und dadurch die Expression induziert. Die OD wurde dann alle 60 min gemessen

und veränderte sich nur noch minimal. Dies deutete darauf hin, dass sich die Bakterien nicht weiter vermehrten und ihre gesamte Energie in die Synthese des rekombinanten Proteins investierten. Nach 6 h wurde die Kultur mit Hilfe einer Zentrifuge bei 5900 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde bis zur weiteren Aufarbeitung (bis maximal 7 Tage) bei -20 °C gelagert. Um das Bakteriensediment zu lösen und die Zellen aufzuschließen wurde 20 ml Lysepuffer zugegeben. Durch wiederholtes Pipettieren konnte eine homogene Lösung erzeugt werden, welche in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Um einen optimalen Aufschluss der Zellen zu erzielen wurde die Zellsuspension 3 Mal 4 min sonifiziert. Dazu wurde ein Sonikatorstab von Bandelin mit der Powereinstellung MS 72/D und der Zyklenzahl von 30 verwendet. Während der Sonifikation wurden die Proben mit Eiswasser gekühlt und zwischen den Behandlungen für 4 min ebenfalls mit Eiswasser gekühlt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt und für 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und die Überstände, welche die Proteine enthielten, wieder vereinigt.

Lysepuffer	
Kaliumphosphat, pH 7,8	50 mM
NaCl	400 mM
KCl	100 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Triton X-100	0,5 % (v/v)
Imidazol	10 mM

**Tabelle 20** Zusammensetzung des Lysepuffers

#### **4.2.9.3 Aufreinigung und Dialyse der Fusionsproteine**

Die erste Auftrennung des Proteinextraktes erfolgte mit einer HisTrap<sup>TM</sup> HP-Säule der Firma GE Healthcare an einem Bio Logic LP Gerät von Biorad. Diese Säule ist mit Nickelmolekülen beladen, welche mit dem His-Tag des Fusionsproteins in Wechselwirkung treten können. Für die Injektion wurde die Lösung in eine Spritze gefüllt und mit dem LEW-Puffer über die Säule gegeben. Während des Laufes wurde die Absorption gemessen. Nach der Injektion der Proteinlösung stieg die Absorption an, da viele zelluläre Bestandteile die Säule ohne Interaktionen mit dem Säulenmaterial verließen. Die Histidine des Tags besitzen Imidazolringe. Durch die Interaktionen dieser Imidazolringe mit den Nickelionen der Säule

kam es zur Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial. Nachdem die Absorption wieder abgesunken und konstant war, wurde zu dem Elutionspuffer, der eine hohe Imidazolkonzentration besaß, gewechselt. Die Erhöhung der Imidazolkonzentration des Puffers führte dazu, dass durch Imidazol die Wechselwirkungen zwischen den AS des His-Tags und dem Säulenmaterial aufgehoben und das Fusionsprotein kompetitiv verdrängt wurde. Der Absorptionsanstieg am Detektor zeigte an, dass die Fusionsproteine die Säule verließen. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Eluat gesammelt. Das Eluat wurde anschließend mit einer Pipette in einen Dialyseschlauch überführt und über 3 h gegen 800 ml 1x PBS auf Eis dialysiert. Nach 1 h und 2 h wurde das PBS ausgetauscht um eine optimale Dialyse zu gewährleisten. Im Anschluss wurde die Konzentration des Fusionsproteins mit Hilfe des NanoDrop Spektrophotometers gegen 1x PBS als Referenz bei A280 gemessen. Die für eine exakte Konzentrationsbestimmung notwendigen Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des ProtParam-Tools von ExPASy (<http://www.expasy.org>) berechnet.

LEW-Puffer	
Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	25 mM
pH auf 8,0 mit 10 M NaOH eingestellt	

**Tabelle 21** Zusammensetzung des LEW-Puffers

Elutionspuffer	
Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
pH auf 8,0 mit 10 M NaOH eingestellt	

**Tabelle 22** Zusammensetzung des Elutionspuffers

	Molekulargewicht (kDa)	Extinktionskoeffizient
HMGB2	37.43	21555
A-Box	23.21	11585
B-Box	23.97	11460
C-Terminus	18.01	1490*

**Tabelle 23** Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der Fusionsproteine, die mit dem ProtParam Tool von ExPASy berechnet wurden.

\* Peptid enthält kein Tryptophan, daher kann der errechnete Extinktionskoeffizient um mehr als 10 % vom tatsächlichen Extinktionskoeffizient abweichen

#### 4.2.9.4 SUMO-Protease Verdau der Fusionsproteine

Nachdem die Konzentration der Fusionsproteine bestimmt wurde erfolgte der Protease-Verdau. Vor der Verwendung wurden 10 µl Proteasestammlösung mit 90 µl SUMO-Protease-Puffer gemischt, wodurch eine Proteasekonzentration von 1 U/µl erzielt wurde. Die Fusionsprotein-Lösung wurde auf 2,0 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt. Für 125-250 µg Fusionsprotein wurde 1 U SUMO-Protease 2 zugegeben. Da der SUMO-Protease-Puffer nicht jedes Mal frisch angesetzt wurde und das DTT in Lösung nicht stabil ist wurden jedem Eppendorfgefäß zusätzlich 8 µl 1 M DTT zugefügt. Der Verdau erfolgte über Nacht in einem Heizblock bei 30 °C. Um den Einfluss des Lichtes auf den Verdau zu unterbinden wurden die Eppendorfgefäße mit Aluminiumfolie abgedeckt.

SUMO-Protease-Puffer	
TrisHCl, pH 8,0	10 mM
NaCl	75 mM
DTT	5 mM
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	1 mM
Glycerin	50 % (v/v)

**Tabelle 24** Zusammensetzung des SUMO-Protease-Puffers

#### 4.2.9.5 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Am nächsten Tag wurden die über Nacht verdauten Proteine vereinigt und in eine Spritze für die Injektion überführt. Wie bei der ersten Auftrennung wurde die Probe mit LEW-Puffer über die HisTrap<sup>TM</sup> HP Säule gegeben. Da der abgespaltene Fusionsproteinteil und die SUMO-Protease einen His-Tag besitzen haben beide Proteine an die Säule gebunden. Sobald

eine Absorptionsänderung am Detektor festgestellt wurde, erfolgte das manuelle Sammeln des Durchlaufs mit dem darin enthaltenen Zielprotein. Im Anschluss wurde die Proteinlösung über eine RP-C18-Säule aufgetrennt. Da bei dem verwendeten HPLC-System der 1200 Serie von Agilent mit eingebauter großer Probenschleife maximal 1,5 ml injiziert werden können, wurde das Volumen der Probe mit einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von unter 1,2 ml eingengt. Da für die optimale Auftrennung mit der Säule ein leicht saurer pH der Probe erforderlich ist, wurde dieser mit 100-200 µl 10 % (v/v) TFA auf einen pH-Wert von 4-5 eingestellt. Für die Auftrennung wurde eine Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min und ein Gradient von Puffer A (H<sub>2</sub>O, 0,18 % (v/v) TFA) und Puffer B (AcN, 0,15 % (v/v) TFA) verwendet. Das exakte Programm des Gradienten ist in Tabelle 25 aufgelistet. Während des Laufs wurde die Absorption bei 214 nm gemessen. Die Elution des Zielproteins wurde durch den Anstieg der Absorption festgestellt und das Protein mit Hilfe des Fraktionssammlers manuell gesammelt. Nach diesem letzten Aufreinigungsschritt wurde die Proteinlösung 2-4 Mal mit einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und das Sediment in H<sub>2</sub>O aufgenommen, um die TFA vollständig aus der Lösung zu entfernen. Der pH-Wert wurde, nachdem das Sediment in 120 µl H<sub>2</sub>O gelöst wurde, mit Hilfe eines Universal-Indikatorpapiers überprüft. Nach wiederholtem Eintrocknen lag der pH-Wert bei 5-6. Die Proteinkonzentration von HMGB2 wurde mit dem NanoDrop und dem durch das ProtParam-Tool von ExPASy ermittelten Molekulargewicht von 24,03 kDa und dem Extinktionskoeffizienten von 20065 bestimmt. Da die Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop auf das Vorhandensein von Tryptophan, Tyrosin und Cystein angewiesen ist, konnte diese Methode bei dem C-Terminus nicht angewendet werden. Die Proteinkonzentrationen der A-Box, B-Box und des C-Terminus wurden daher durch einen auf Bicinchoninsäure basierenden Assay nach Smith (Smith et al., 1985), mit leichten Modifikationen, bestimmt. Für diesen Assay wurden 10 µl Proteinlösung mit 200 µl Puffer (4 % (w/v) Kupfer(II)-Sulfat-Lösung, 2 % (v/v) Bicinchoninsäure) in einer Mikrotiterplatte gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 570 nm in einem Platten-Reader (Wallac Victor 1420) gemessen. Für die Quantifizierung wurde eine Standardkurve aus BSA erstellt. Alle Bestimmungen erfolgten in Duplikaten mit anschließender Berechnung des Mittelwerts. Wenn sich die Proteinkonzentration der Proben außerhalb der Standardkurve befand, wurde die Messung mit verdünnter Proteinlösung wiederholt. Die Reinheit der rekombinant exprimierten Proteine wurde außerdem durch eine SDS-PAGE mit Coomassie- und Silberfärbung sowie mit einer RP-C18-Auftrennung überprüft.

Zeit	Konzentration Puffer B
15 min	5 %
50 min	5 – 52 %
5 min	52 – 95 %
5 min	95 – 5 %
5 min	5 %

**Tabelle 25** Zusammensetzung des Gradienten der RP-C18-Auftrennung

#### **4.2.10 Analyse der Reinheit der rekombinanten Proteine mit Hilfe der HPLC**

Um die rekombinant exprimierten Proteine auf ihre Reinheit zu überprüfen wurden jeweils 15 µg mit einer RP-C18-Säule aufgetrennt. Dazu wurden die Proteine mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt und 15 µl injiziert. Die Fließmittelgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min und die Absorption wurde bei 214 nm gemessen. Die Zusammensetzung des Gradienten ist in Tabelle 25 aufgeführt.

#### **4.2.11 Radial Diffusion Assay**

Um die antimikrobielle Aktivität zu messen wurde ein Radial Diffusion Assay (RDA) nach Lehrer (Lehrer et al., 1991) verwendet. Bei dem Assay wurden Bakterien in einem Gel, das eine spezielle Agarose mit besonders wenigen Eigenladungen besitzt, immobilisiert und mit der zu testenden Probe inkubiert. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die Bereiche um die Probenlöcher untersucht. War dort ein Hemmhof zu finden, hatten Probenbestandteile Bakterien am Wachstum gehindert und besaßen damit antimikrobielle Aktivität.

Die Anzucht von *Escherichia coli* K12 erfolgte über Nacht bei 37 °C auf Columbia Blutagar Platten. Bei allen anderen untersuchten Mikroorganismen handelte es sich um anaerobe Bakterien. Diese wurden ebenfalls bei 37 °C auf Columbia Blutagar Platten inkubiert, die Inkubation dauerte jedoch 48 h und wurde in einem Anaerobiertopf von Oxoid durchgeführt. Durch die Verwendung von „Anaero Gen“ Beuteln konnte in dem Topf eine anaerobe Atmosphäre (<1 % O<sub>2</sub>) generiert werden. Mit Hilfe eines Indikatorpapiers wurde überprüft ob tatsächlich anaerobe Bedingungen im Topf erzeugt wurden. Vor jedem RDA wurden Under- und Overlaygele in ausreichender Menge hergestellt, der pH des Underlaygels auf 5,7 oder 7,4 mit 1:100 verdünnter HCl eingestellt und die Gele autoklaviert. Am Vortag des Versuchs

wurden mit einzelnen Bakterienkolonien 10 ml TSB-Medium in 50 ml Reaktionsröhrchen angeimpft und die Kultur für 16 - 20 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Bei der Verwendung von *E. coli* K12 wurden am Versuchstag 10 µl der Kultur in 10 ml frisches, vorgewärmtes TSB-Medium überimpft. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für ungefähr 2,5 h auf einem Schüttler und das Abzentrifugieren der Kultur bei 4 °C und 1000 x g für 10 min. Bei der Verwendung von anaeroben Bakterien wurden die 10 ml der Übernachtskultur ohne umimpfen direkt verwendet und abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde dann in 10 ml eiskaltem 10 mM Phosphatpuffer resuspendiert und ein zweites Mal abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 5 ml eiskaltem 10 mM Phosphatpuffer resuspendiert und die Optische Dichte (OD) bei 620 nm, gegen Phosphatpuffer als Referenz, photometrisch bestimmt. Bei *E. coli* K12 wurde eine Colony-forming unit (CFU) von ungefähr  $4 \times 10^6$  pro ml verwendet. Die Menge der benötigten Bakteriensuspension wurde mit der Formel  $\text{CFU/ml} = \text{OD}_{620} \times 2,5 \times 10^8$  ermittelt. Bei allen anderen Bakterien wurde die OD bei 620 nm mit 10 mM Phosphatpuffer auf 0,1 eingestellt. Bei Laktobazillen wurden 300 µl und bei den restlichen anaeroben Bakterien 150 µl für die Gele verwendet. Während die Bakterien das zweite Mal zentrifugiert wurden, wurde das Underlaygel in der Mikrowelle aufgeköcht, in 10 ml Portionen auf 50 ml Reaktionsröhrchen verteilt und auf 46 °C in einem Wasserbad abgekühlt. Mit einer Pipette wurde dann die benötigte Menge Bakteriensuspension in die vorgelegten Gele gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurden die Gele mit den Bakterien durchmischt und anschließend in Petrischalen gegossen. Wenn mit den Gelen ein reduzierendes Milieu untersucht werden sollte, wurde zusätzlich zu den Bakterien 1 M DTT zugegeben und eine Endkonzentration von 2 mM DTT eingestellt. Nach dem Aushärten der Gele wurden mit einem „Biopsy Punch“ Probenlöcher mit einem Durchmesser von 2,5 mm erzeugt und die Gelstücke aus diesen Löchern mit Ethanol-desinfizierten Pipettenspitzen entfernt. Die ersten beiden Probenlöcher jedes Gels wurden mit den Kontrollen, 4 µl H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle bzw. 4 µl (0,25 µg/µl) Lysozym als Positivkontrolle, befüllt. Die restlichen Probenlöcher wurden mit 4 µl der zu untersuchenden Proteinlösung beladen. Es folgte eine Inkubation über 3 h bei 37 °C mit Deckel nach oben im Brutschrank. Anaerobe Bakterien wurden zu denselben Bedingungen im Anaerobiertopf inkubiert. Während diesem Zeitraum konnten die Proteine, abhängig von ihren Eigenschaften, in das Gel um die Probenlöcher diffundieren. Die Bakterien können aufgrund des niedrigen Nährstoffgehalts im Gel überleben, sind jedoch nicht in der Lage sich in großem Maße zu vermehren. Nach ungefähr 2,5 h wurde das nährstoffreiche Overlaygel in der Mikrowelle aufgeköcht, in 10 ml Portionen

auf 50 ml Reaktionsröhrchen aufgeteilt und bei 46 °C im Wasserbad abgekühlt. Es folgte das Überschichten des Underlaygels mit dem Overlaygel. Nach dem Aushärten wurden die Gele mit dem Deckel nach unten bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Die Inkubation der anaeroben Bakterien erfolgte im Anaerobiertopf. Am nächsten Tag wurden die Bereiche um die Probenlöcher untersucht. Wenn ein Hemmhof vorhanden war, zeigte dies antimikrobielle Aktivität an und der Durchmesser des Hemmhofs wurde ausgemessen. Zur Dokumentation der Gele wurden diese mit 20 ml Coomassie Färbelösung für 15 – 30 min auf einem Schüttler inkubiert, 2 – 3 Mal mit 20 ml Coomassie Entfärbelösung gewaschen und abschließend mit einem Scanner digitalisiert.

Tryptic Soy Broth (TSB)-Medium	
TSB-Pulver	15 g
H <sub>2</sub> O	500 ml
	autoklavieren (20 min bei 121 °C)

**Tabelle 26** Zusammensetzung des TSB-Medium

200 mM Phosphatpuffer (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,8 g
H <sub>2</sub> O	500 ml

**Tabelle 27** Zusammensetzung des 200 mM Phosphatpuffers (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

200 mM Phosphatpuffer (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,8 g
H <sub>2</sub> O	500 ml

**Tabelle 28** Zusammensetzung des 200 mM Phosphatpuffers (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4	
200 mM Phosphatpuffer (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	47,5 ml
200 mM Phosphatpuffer (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	202,5 ml
H <sub>2</sub> O	250 ml
	autoklavieren (20 min bei 121 °C)

**Tabelle 29** Zusammensetzung des 100 mM Phosphatpuffers, pH 7,4

10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4	
100 mM Phosphatpuffer	10 ml
H <sub>2</sub> O	90 ml
	autoklavieren (20 min bei 121 °C)

**Tabelle 30** Zusammensetzung des 10 mM Phosphatpuffers, pH 7,4

	Underlaygel	Overlaygel
EEO-Agarose	0,5 g	0,5 g
1 x TSB	0,5 ml	-
TSB Pulver	-	3 g
100 mM Phosphatpuffer	5 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	45 ml	45 ml

**Tabelle 31** Zusammensetzung des Underlay- und Overlaygels (5x Ansatz)

#### 4.2.12 Trübungsassay

Der zweite Assay, der zum Nachweis der antimikrobiellen Aktivität verwendet wurde, basierte auf Wachstumshemmung von Bakterien in Flüssigkulturen. Nachdem die Bakterien mit der zu untersuchenden Probe inkubiert wurden, erfolgte die Messung der OD in regelmäßigen Abständen. Je geringer die OD nach Inkubation mit der Probe anstieg, desto stärker war die antimikrobielle Aktivität der Probe und damit die inhibitorische Wirkung auf das Bakterienwachstum. Die Methode wurde aus einer Veröffentlichung von Ericksen *et al.* (Ericksen et al., 2005) entnommen und partiell modifiziert.

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurde *E. coli* K12 von einer Glycerin-Stockkultur auf Columbia Blutagar Platten ausplattiert. Am Tag vor dem Versuch wurde eine einzelne Kolonie gepickt, mit dieser 10 ml TSB-Medium angeimpft und erneut über Nacht inkubiert. Am Tag der Versuchsdurchführung wurden 60 µl der Kultur verwendet um damit 6 ml frisches 1x TSB-Medium anzuimpfen. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator. Die OD wurde bei 600 nm in regelmäßigen Abständen gemessen. Sobald die OD einen Wert von 0,5 erreicht hatte, wurden die Bakterien bei 4 °C und 1000 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit AMA-Puffer gewaschen. Dazu wurde dieses in 5 ml Puffer aufgenommen und die Lösung erneut 10 min zu denselben Bedingungen zentrifugiert. Es folgte ein erneutes Aufnehmen des Sediments in 5 ml AMA-Puffer und die Messung der OD bei 600 nm mittels Photometer. Durch verdünnen mit AMA-Puffer wurde die OD<sub>600nm</sub> auf 0,5 eingestellt und anschließend 1:1000 mit AMA-

Puffer verdünnt, wodurch eine Bakterienmenge von ungefähr  $5 \times 10^5$  CFU/ml erzielt wurde. Von der Bakterienlösung wurden dann jeweils 90 µl in die Öffnungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Während des Pipettierens stand die Platte auf Eis um ein unerwünschtes Bakterienwachstum zu verhindern. Zu der vorgelegten Bakterienlösung wurden 10 µl der zu testenden Probe gegeben. Als Positivkontrolle dienten 3 µg Lysozym und 1 µg HBD-3. Bei der Negativkontrolle wurden 10 µl H<sub>2</sub>O verwendet. Von HMGB2 wurden verschiedene Konzentrationen (1 µg/ml - 10 µg/ml) getestet. Nach der Zugabe der Proben wurde die Mikrotiterplatte für 1 h auf einem Wippschüttler bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl 2x TSB-Medium zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1x TBS erzielt wurde. Nach der TSB-Zugabe wurde die Absorption der Proben mit Hilfe eines Platten-Readers (Wallac Victor 1420) bei 590<sub>nm</sub> gemessen. Die Absorption zu diesem Zeitpunkt diente als Nullwert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte wieder auf den Wippschüttler gestellt und weiter bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte dann alle 60 min bis zum Zeitpunkt 7 h.

AMA-Puffer	
Phosphatpuffer, pH 7,4	10 mM
TSB Flüssigmedium	1 % (w/v)

**Tabelle 32** Zusammensetzung des AMA-Puffers

#### 4.2.13 Immunhistochemie

Die ersten Schritte, einschließlich des Aufbringens der Schnitte auf Objektträger, wurden durch eine Technische Assistentin durchgeführt. Die Biopsien wurden mit Hilfe eines Automaten entwässert, indem sie für 2 h mit 4 % (v/v) Formalin und 2 Mal 30 min mit 70 % (v/v) Ethanol und 30 min mit 96 % (v/v) Ethanol behandelt wurden. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt in 96 % (v/v) Ethanol für 1 h und 3 Inkubationen für jeweils 1 h in 100 % (v/v) Isopropanol. Anschließend wurden die Proben 2 Mal 1 h in Xylol, 2 Mal 30 min in Paraffin und dann 2 Mal für 1 h in Paraffin überführt. Daraufhin wurden die Blöcke gegossen. Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mit einem Mikrotom von Leica und einer Schnittdicke von 3 µm. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgebracht. Diese wurden dann für 30 min in Neoclear-Lösung und anschließend jeweils 2 min in 100 % (v/v), 96 % (v/v), 70 % (v/v) Ethanol und in H<sub>2</sub>O überführt um die Schnitte zu rehydrieren. In einer zweiten Küvette wurde Dampfgarer-Puffer (pH 9,0) von der Firma Dako vorgewärmt.

Die Schnitte wurden dann in diesen Puffer überführt und für 30 min im Dampfgerar inkubiert. Anschließend wurde der Dampfgerar-Puffer mit den Proben ohne Deckel für 20 min bei Raumtemperatur zum Abkühlen stehen gelassen. Es folgten 2 Waschschrirte für jeweils 5 min mit Waschruffer (Tris-Buffered Saline mit 0,1 % (v/v) Tween 80, TBST). Im Anschluss wurden die Schnirte mit „Endogene Peroxidase Blocking-Solution“ behandelt. Dazu wurden jeweils 2 Tropfen der Lösung mit einer Pasteur Pipette auf die Schnirte gegeben, ein Deckglas aufgebracht und 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Entfernen der Deckgläser wurden die Schnirte 3 Mal 5 min gewaschen (Waschruffer, VE-Wasser, Waschruffer). Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 100 µl HMGB2-Antikörper-Lösung (0,21 µg/ml in TBST) auf die Schnirte, das Aufsetzen eines Deckglases und eine Inkubation über 1 h in der feuchten Kammer. Bei der Negativkontrolle wurden anstelle der Antikörper-Lösung 100 µl H<sub>2</sub>O auf den Schnitt pipettiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch 3 Mal 5 min waschen (Waschruffer, VE-Wasser, Waschruffer) entfernt. Es folgte die Zugabe von 2 Tropfen HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (Dako Envision Kit, Lösung A) und eine 30-minütige Inkubation mit Deckglas in der feuchten Kammer. Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Objektträger erneut 3 Mal 5 min gewaschen (Waschruffer, VE-Wasser, Waschruffer). Im Anschluss wurden je 100 µl der DAB-Färbelösung (Dako Envision Kit, 20 µl Lösung C und 1 ml Lösung B) auf die Objektträger gegeben und diese mit Deckglas 10 min in der feuchten Kammer inkubiert. Die restliche Färbelösung wurde durch 5 min waschen mit fließendem Leitungswasser entfernt. Um die Zellkerne gegen zu färben wurden die Schnirte in einer Küvette für 15 s mit Hämalaun inkubiert. Anschließend wurden die Schnirte für 10 min unter fließendem Wasser gewaschen. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % (v/v), 96 % (v/v) und 100 % (v/v) Ethanol) bei der die Proben für je 1 min mit dem entsprechenden Alkohol behandelt wurden. Abschließend wurden die Schnirte für 10 min in Neoclear-Lösung inkubiert, mit 2 Tropfen Eindeckmedium (DePeX Gurr) versehen und eingedeckt. Die Auswertung der gefärbten Schnirte und Aufnahme der Fotos erfolgte an einem Leica DM 4000 B Mikroskop und der Leica Application Suite Software.

TBST (10x)	
Tris	30 g
NaCl	80 g
KCl	2 g
Tween 20	1 ml
H <sub>2</sub> O	auf 1 l auffüllen

**Tabelle 33** Zusammensetzung des TBST

Hämalaun	
Hämatoxylin	1 g
H <sub>2</sub> O	1 l
Natriumjodat	0,2 g
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	50 g
Chloralhydrat	50 g
Zitronensäure	1 g
14 Tage offen stehen lassen, mehrmals umrühren	

**Tabelle 34** Zusammensetzung der Hämalaun-Lösung

#### 4.2.14 Transmissionselektronenmikroskopie

Am Vortag der Versuchsdurchführung wurde Schädler-Medium mit H<sub>2</sub>O 1:6 verdünnt, mit *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Versuchstag wurden die Bakterien auf eine OD<sub>515</sub> von 0,3 mit 1:6 verdünntem Schädler-Medium eingestellt. 450 µl der Bakterienlösung wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 130 µg (50 µl) rekombinantem HMGB2 versetzt, sodass dadurch eine Endkonzentration von 260 µg/ml erreicht wurde. Bei der Negativkontrolle wurden anstatt der Proteinlösung 50 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Es folgte eine Inkubation über 2 h bei 37 °C im Brutschrank. Um zu überprüfen, ob das Abtöten der Bakterien erfolgreich war wurden beiden Ansätzen 10 µl entnommen, mit 90 µl PBS verdünnt, auf Columbia Blutagar Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnte bei den mit HMGB2 behandelten Bakterien im Vergleich zur Negativkontrolle ein deutlich vermindertes Wachstum (Faktor 2-3) festgestellt werden. Nach der Inkubation wurden beiden Ansätzen außerdem 40 µl für eine durchflusszytometrische Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität entnommen. Die Messung ergab, dass bei dem mit HMGB2 behandelten Ansatz 52 % mehr Bakterien abgestorben waren als bei der unbehandelten Kontrolle. Die für die Fixierung

erforderlichen Karnovsky`s Lösungen (A und B) wurden auf 30 °C erwärmt und anschließend gemischt. Die Bakterienlösungen wurden abzentrifugiert (4500 x g), das Sediment mit der Lösung resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Kühlschrank gelagert. Die weitere Aufarbeitung der Proben und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden durch Mitarbeiter von Professor Schaller in Tübingen durchgeführt. Die Proben wurden zentrifugiert, das Sediment in 3,5 % (w/v) Agarose bei 37 °C resuspendiert und dann bei Raumtemperatur koaguliert. Anschließend wurden die Proben in kleine Stücke geschnitten und erneut in Karnovsky`s-Lösung für mindestens eine Stunde fixiert. Es folgte eine weitere Fixierung mit Fixierlösung über 2 h. Im Anschluss wurden die Blöcke in Glycidether eingebettet und mit einem Ultracut Microtome der Firma Reichert geschnitten. Dabei wurde eine Schnittdicke von 30 nm verwendet. Abschließend wurden die Schnitte auf ein Kupfernetz aufgebracht und mit einem Zeiss LIBRA 120 Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

Fixierlösung	
Osmiumtetroxid	1,0 % (w/v)
Kaliumferrocyanid	1,5 % (w/v)
Dimethylarinsäure	0,1 M

**Tabelle 35** Zusammensetzung der Fixierlösung

#### **4.2.15 Durchflusszytometrische Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität**

Um sicherzugehen, dass die Behandlung von *S. aureus* mit HMGB2 Effekte auf das Wachstum der Bakterien hatte, wurden die Proben bevor sie mit dem Karnovsky`s Reagenz gemischt und in Tübingen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht wurden, auf ihre Vitalität überprüft. Dazu wurden die Proben mit einem Assay, der von Nuding *et al.* etabliert wurde und auf der Durchflusszytometrie basiert, untersucht (Nuding et al., 2006). Bei dem Assay werden die Bakterien, nachdem sie mit dem zu testenden Protein inkubiert wurden, mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) ((bis-(1,3-Dibutyl-barbitursäure)-Trimethinoxonol) versetzt. Bei DiBAC<sub>4</sub>(3) handelt es sich um einen membranpotentialsensitiven Farbstoff, welcher sich bei intakten Bakterien an den äußeren Bereich der Zellmembran anlagert. Kommt es durch die Behandlung mit antimikrobiellen Proteinen zu einer Schädigung der Zellmembranen und zum Tod der Bakterien hat dies eine Depolarisierung der Membran zur

Folge. Der Farbstoff kann daraufhin in die Zellen diffundieren und sich an lipidreiche Regionen anlagern. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können tote von lebenden Bakterien aufgrund des Fluoreszenzanstieges unterschieden und der Anteil an toten Bakterien bestimmt werden.

Um zu überprüfen, ob durch die Behandlung von *S. aureus* mit HMGB2 eine Abtötung der Bakterien erzielt werden konnte, wurden nach der Inkubation mit dem Protein 40 µl der Lösung entnommen und mit 2 µl DiBAC<sub>4</sub>(3)-Lösung (Stammlösung zuvor 1:50 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) versetzt. Bei der Negativkontrolle wurde dieselbe Menge entnommen und ebenfalls 2 µl Farbstoff zugegeben. Nach einer Inkubation über 5 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation bei 4500 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 100 µl FACS-Flow aufgenommen und die Messung an einem FACSCalibur<sup>TM</sup>-Gerät durchgeführt. Es wurden jeweils 10000 Events pro Messung mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung: 5 mg DiBAC<sub>4</sub>(3), 500 µl Methanol

#### 4.2.16 Sequenzierungen

Die durchgeführten Sequenzierungen basierten auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) und wurden an einem ABI3500DX von Applied Biosystems und dem „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ durchgeführt. Die Sequenzier-PCR wurde nach Protokoll des Herstellers und den im Vektor bindenden Primern, die in Tabelle 36 aufgeführt sind, durchgeführt. Anschließend wurde die DNA präzipitiert, gewaschen und in Nuklease-freies Wasser von Merck aufgenommen. Nach der Elektrophorese wurden die Chromatogramme mit der Geneious Software ausgewertet und mit den Referenz-Sequenzen verglichen.

Primername	Sequenz
Sumo: Sumo Vorwärts	5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3'
Sumo: T7 Rückwärts	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'
pCR2.1-Topo: T7 Vorwärts	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
pCR2.1-Topo: M13 Rückwärts	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

**Tabelle 36** Verwendete Primer für die Sequenzierungen

Ready Reaction Premix 1.1	2 µl
Big Dye Sequencing Buffer	1 µl
Primer Forwärts oder Rückwärts (3,2 pmol)	1 µl
DNA-Template	X µl (50 ng)
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	auf 10 µl aufgefüllt

**Tabelle 37** Pipettierschema der Sequenzier-PCRs

Die mit \* gekennzeichneten Komponenten sind Bestandteil des „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“

PCR-Bedingungen der Sequenzierungen:

96 °C	1 min		
96 °C	10 s	}	24 Zyklen
50 °C	5 s		
60 °C	4 min		
12 °C	10 min		

## 4.2.17 Analyse der mRNA-Expression

### 4.2.17.1 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese

Die RNA wurde aus Biopsien mit Hilfe einer Phenol/Chlorophorm-Extraktion durch eine Technische Assistentin gewonnen. Dazu wurden die Biopsien mit einem Pistill in flüssigem Stickstoff zerkleinert und mit 1000 µl Trizol Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation über 10 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben und das Gemisch erneut 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12500 x g und 4 °C, bei der sich 3 Phasen bildeten. Die unterste Phenol-Chloroform-Phase enthielt die Proteine und Lipide, die mittlere Interphase die DNA und die sich oben befindende Phase die RNA. Die oberste Phase wurde abgenommen und die RNA mit 99,7 % (v/v) Isopropanol präzipitiert. Abschließend wurde die RNA mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl 0,1 % (v/v) Diethylcarbonat (DEPC)-Wasser resuspendiert. Die Qualität der RNA wurde mit dem Agilent RNA 600 nano Kit an einem Agilent 2100 Bioanalyser überprüft und die Konzentration der RNA mit einem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. 1 µg Gesamt-RNA wurden mit Oligo-(dT)-Primern und der AMV- reversen Transkriptase nach dem Protokoll des Herstellers (Promega) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg RNA auf ein Endvolumen von 9,75 µl verdünnt und für 10 min bei 70 °C inkubiert um eine Linearisierung

potentieller Doppelstränge zu erreichen. Es folgte die Zugabe von 10,25 µl eines Mastermix, der nach Herstellerprotokoll erstellt wurde. Abschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 42 °C und 5 min bei 95 °C im Thermocycler inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

DEPC-Wasser	
DEPC	2 ml
H <sub>2</sub> O	2 l
	über Nacht rühren, dann autoklavieren

**Tabelle 38** Zusammensetzung des DEPC-Wassers

#### 4.2.17.2 Konstruktion der Plasmide

Um genaue mRNA-Expressionswerte zu erhalten, wurde ein Plasmid für die Erstellung einer Standardkurve erstellt. Für die Amplifizierung wurden die in Tabelle 41 angegebenen Primer und die HotStarTaq DNA-Polymerase nach Herstellerprotokoll (Qiagen) verwendet. Als Template dienten cDNA-Proben. Das Produkt wurde mit einem Gel (1 % (w/v) Agarose in 1x TAE, 2 Tropfen 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid) überprüft, mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt und die DNA Konzentration mittels NanoDrop gemessen. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt in den PCR2.1-TOPO-Vektor durch eine TA-Klonierung eingebracht und das Konstrukt in TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert. Für die Klonierung und Transformation wurden die Reagenzien und Zellen des TOPO TA Cloning Kits nach Herstellerprotokoll verwendet. Im Anschluss wurden 25 µl und 50 µl der Transformations-Lösung auf LB-Ampicillin-Agaroseplatten ausplattiert. Um Klone, die ein Vektor mit Insert besitzen, von Klonen mit Vektoren ohne Insert unterscheiden zu können, wurden die Platten vor der Benutzung mit 40 µl X-Gallösung (40 mg X-Gal/ml in N,N-Dimethylformamid) versetzt. Nach einer über Nacht-Inkubation bei 37 °C waren sowohl blaue Kolonien, bei denen durch Religation des Vektors die β-Galaktosidase das X-Gal umsetzen konnte, als auch weiße Kolonien, bei denen durch Einbau von DNA in den Vektor enzymatischer Abbau des X-Gal nicht mehr möglich war, zu finden. Von den weißen Kolonien wurden 10 ausgewählt und mit diesen jeweils 5 ml LB-Ampicillin-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep spin Miniprep Kits nach Protokoll des Herstellers. Dazu wurden die Bakterien lysiert und die DNA mit alkalischem Puffer denaturiert. Nach Zugabe

eines Neutralisierungs-Puffers wurde die DNA von den restlichen zellulären Bestandteilen durch eine Zentrifugation getrennt. Um eine hohe Reinheit zu erreichen, wurde die an die Säule gebundene DNA 2 Mal gewaschen und anschließend mit Nuklease-freiem Wasser eluiert. Abschließend wurde die Konzentration der DNA mit dem NanoDrop ermittelt. Die Erstellung des  $\beta$ -Actin-Plasmids erfolgte durch eine Technische Assistentin nach dem gleichen Protokoll.

LB-Ampicillin-Agaroseplatten	
Luria Agar	40 g
H <sub>2</sub> O	auf 1 l auffüllen
	autoklavieren und auf ca. 55 °C abkühlen lassen
Ampicillinlösung (100 mg Ampicillin / ml H <sub>2</sub> O)	1000 $\mu$ l
	gießen des Mediums in Petrischalen

**Tabelle 39** Protokoll für die Erstellung der LB-Ampicillin-Agaroseplatten

LB-Ampicillin-Medium	
Luria Broth	20 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O	500 ml
Ampicillinlösung (100 mg Ampicillin / ml H <sub>2</sub> O)	500 $\mu$ l

**Tabelle 40** Zusammensetzung des LB-Ampicillin-Mediums

Primernamen	Sequenz
HMGB2-exp-for	5'-TTACGTTCTCCCAAAGGTG-3'
HMGB2-exp-rev	5'-TCTTTGGCTGACTGCTCAGA-3'
$\beta$ -Actin-for	5'-GCCAACC GCGAGAAGATGA-3'
$\beta$ -Actin-rev	5'-CATCACGATGCCAGTGGTA-3'

**Tabelle 41** Primer für die Erstellung der Plasmide und die Quantifizierung der mRNA

#### 4.2.17.3 Restriktionsverdau der Plasmide

Um zu überprüfen, ob das Insert des Vektors die erwartete Größe besitzt, wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI von NEB durchgeführt. Dazu wurden 1000  $\mu$ g Plasmid-DNA mit 1  $\mu$ l Enzym (entspricht 1 Unit) und 2  $\mu$ l NEB-Puffer 2 versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 17  $\mu$ l gebracht. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 h. Der Verdau wurde

anschließend mit 3 µl Xylencyanol-Probenpuffer versetzt und in einem Gel (1 % (w/v) Agarose in 1x TAE, 2 Tropfen 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid) neben einem Größenstandard (100 bp DNA Ladder) aufgetrennt, um die Größe des Inserts festzustellen. Um Mutationen auszuschließen wurde Plasmid-DNA, bei dem das Insert die korrekte Größe zeigte, anschließend sequenziert. Die Überprüfung des  $\beta$ -Actin-Plasmids erfolgte durch eine Technische Assistentin.

#### **4.2.17.4 Real-time PCR**

Quantitative PCRs wurden an einem LightCycler 480 von Roche unter Verwendung des DNA-bindenden Fluorochroms SYBR Green I durchgeführt. SYBR Green I ist in der Lage, sich in doppelsträngige DNA einzubauen, wodurch es zu einem Anstieg der Fluoreszenz des Farbstoffs kommt. Durch die Messung der Fluoreszenz am Ende von jedem Zyklus, kann die Zunahme der DNA-Menge ermittelt werden. Durch eine zusätzliche Bestimmung der Schmelzkurve wurde außerdem die Spezifität der PCR überprüft. Um die Zahl der Kopien genau berechnen zu können, wurde aus dem hergestellten Plasmid eine Standardkurve von 1 ng bis  $10^{-7}$  ng, in 1:10 Verdünnungsschritten erstellt. Der SYBR Green I-Mastermix wurde nach Herstellerangaben verwendet. Das exakte PCR-Programm ist am Ende des Abschnitts aufgeführt. Sowohl die Quantifizierung des PCR-Produkts, als auch die Schmelzkurven-Analyse wurden mit der LightCycler Software 3.5 durchgeführt. Die Quantifizierung des  $\beta$ -Actins wurde durch eine Technische Assistentin durchgeführt.

Bedingungen der Real-time PCRs:

HMGB2:

Denaturieren	96 °C	5 min	
Amplifikation	96 °C	10 s	} 45 Zyklen
	58 °C	5 s	
	72 °C	15 s	
Schmelzkurve	95 °C	1 s	
	56 °C	15 s	
	95 °C	∞	

β-Actin:

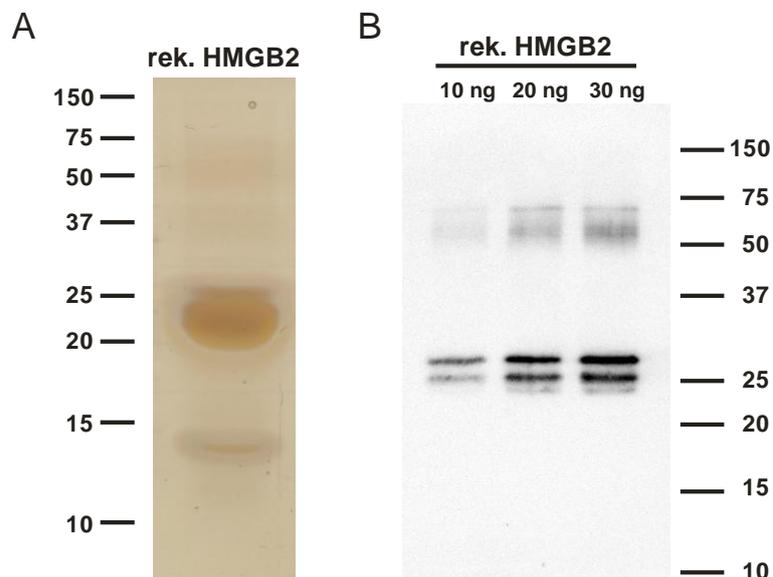
Denaturieren	95 °C	10 min	
Amplifikation	95 °C	15 s	} 45 Zyklen
	60 °C	5 s	
	72 °C	10 s	
Schmelzkurve	95 °C	1 s	
	56 °C	15 s	
	95 °C	∞	

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Rekombinante Expression von HMGB2

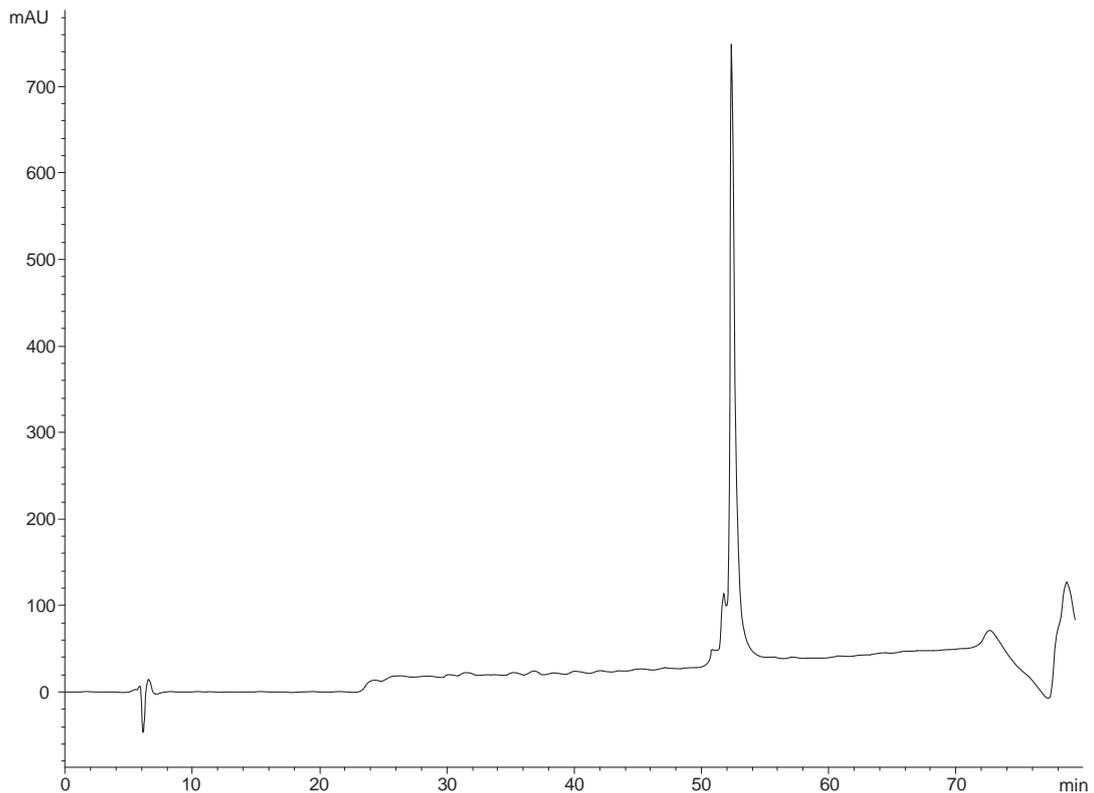
Um die Funktionen von Proteinen genau untersuchen zu können werden meist größere Mengen von diesen benötigt. Da die Extraktion von Proteinen aus humanen Proben große Mengen an Gewebe voraussetzt und die tatsächliche Ausbeute nicht genau vorausgesagt werden kann, wurde das HMGB2-Protein rekombinant in *E. coli* hergestellt. Für die ersten Expressionsversuche wurde humane cDNA für die Klonierung verwendet. Trotz erfolgreicher Transformation des Vektors war es auch durch verschiedenste Modifikationen der Expressionsbedingungen, wie IPTG-Menge, Temperatur oder Zeit, nicht möglich HMGB2 im Bakterienlysat nachzuweisen. Erst nachdem die *HMGB2*-Nukleotidsequenz auf die Codon-Usage von *E. coli* optimiert wurde, war es möglich HMGB2-Protein im Lysat nachzuweisen. Dieses Ergebnis zeigt, dass es wichtig ist die Codon-Usage von Empfänger und Wirt bei der Planung von Expressionsversuchen zu berücksichtigen. Nachdem dieses Problem gelöst war, konnten in relativ kurzer Zeit ausreichende HMGB2-Mengen exprimiert werden. Um eine optimale Aufreinigung zu erzielen, bei der das Protein am Ende in nahezu reiner Form vorliegt, wurde diese mehrfach modifiziert. Nach verschiedenen Aufreinigungsschritten wurde die Reinheit des Proteins durch SDS-PAGE mit Coomassie- oder Silberfärbungen überprüft und die verwendeten Puffersubstanzen auf Aktivität mit dem RDA untersucht, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Teilweise zeigten Puffersubstanzen Aktivität, daraufhin musste die Aufreinigung weiter optimiert werden. Letztendlich konnte jedoch eine hohe Reinheit durch die wiederholte Verwendung der HisTrap<sup>TM</sup> HP-Säule und der RP-C18-Säule erreicht werden. Durch diese Auftrennung und das abschließende Eintrocknen mit Hilfe der Vakuumzentrifuge wurden alle störenden Puffersubstanzen der Aufarbeitung aus der Lösung entfernt. In der Abbildung 2 A ist ein mit Silbernitrat gefärbtes 18 %iges SDS-Gel zu sehen, bei dem das rekombinant exprimierte Protein aufgetragen wurde. Das HMGB2-Protein ist bei einer Größe von ungefähr 24 kDa mit einer intensiven Bande sichtbar und entspricht damit der Proteingröße der UniProt-Datenbank von 24,034 kDa (P26583). Darüber hinaus kann ein kleines Protein mit einer Größe von circa 12 kDa festgestellt werden. Diese Bande konnte nur detektiert werden, wenn hohe Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden. Es handelt sich eventuell um ein Abbauprodukt des HMGB2, das in geringen Konzentrationen vorkommt. Neben diesen Banden ist eine weitere schwache Bande bei circa 50 kDa zu

erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein HMGB2-Dimer, da diese Bande durch Erhöhung der reduzierenden Bestandteile des Probenpuffers (DTT-Menge) in ihrer Intensität abnahm. Da HMGB1 und HMGB2 sehr ähnlich sind und von HMGB1 bereits eine Dimerisierung beschrieben wurde, ist diese Form der Zusammenlagerung auch für HMGB2 naheliegend (Yang et al., 2012). Um zu überprüfen, ob es sich bei dem exprimierten Protein tatsächlich um HMGB2 handelt wurden Westernblots mit HMGB2-spezifischem Antikörper durchgeführt. In Abbildung 2 B ist ein solcher Blot, bei dem ein 12 %iges SDS-Gel verwendet wurde, zu sehen. Im Bereich um 25 kDa ist eine Doppelbande nachweisbar, welche auch in den meisten Coomassie-gefärbten SDS-Gelen detektiert werden konnte. Es handelt sich wahrscheinlich um zwei unterschiedlich modifizierte HMGB2-Varianten. Einige Modifikationen, wie Phosphorylierungen oder Acetylierungen des HMGB2, wurden bereits beschrieben und sind in der UniProt-Datenbank aufgeführt. Außerdem könnte es sich bei dem kleineren Protein der Doppelbande um eine verkürzte HMGB2-Variante handeln. Die leichten Abweichungen in der Größe des HMGB2 der Silberfärbung und der Doppelbande des Blots lassen sich eventuell auf die verschiedenen Probenpuffer und die unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen im Gel zurückführen. Im Bereich um die 50 kDa ist auch im Westernblot eine schwache Doppelbande zu erkennen. Die Erkenntnis, dass diese Doppelbande ebenfalls durch den Antikörper erkannt wird, bekräftigt die Hypothese, dass es sich um eine dimere Form des HMGB2 handelt.



**Abbildung 2** Reinheit des rek. HMGB2 – Silberfärbung & Westernblot. Die Abbildung A enthält einen Ausschnitt eines mit Silbernitrat gefärbten 18 %igen SDS-Gels, bei dem 3 µg des rek. HMGB2 mit Probenpuffer 2 gemischt und aufgetragen wurden. Abbildung B zeigt einen Westernblot, bei dem ein 12 %iges SDS-Gel verwendet und das HMGB2-Protein mit Probenpuffer 1 versetzt wurde.

Zusätzlich zu der Analyse mit den SDS-Gelen wurde die Reinheit des HMGB2 mit Hilfe einer Auftrennung über eine RP-C18-Säule überprüft. Das Chromatogramm eines solchen Laufs ist in Abbildung 3 zu sehen. Es ist ein einzelner Peak bei 52 min und einer AcN-Konzentration von ungefähr 34 % zu detektieren, was für einen hohen Reinheitsgrad spricht. Abschließend ist festzuhalten, dass die Etablierung der rekombinanten Expression von HMGB2 komplex und zeitaufwendig war, jedoch zu einem sehr reinen Protein geführt hat.

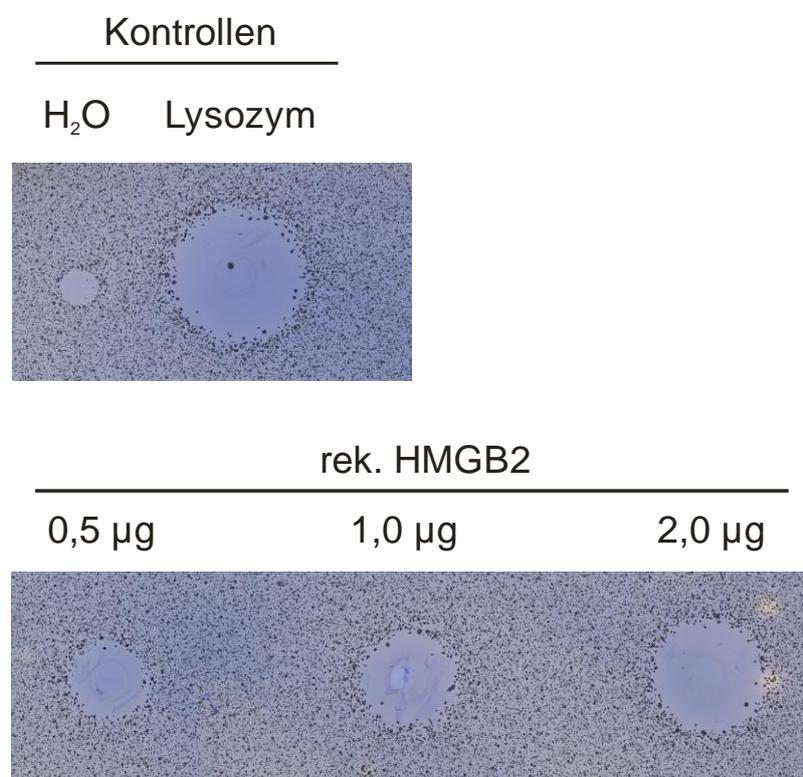


**Abbildung 3** Reinheit des rek. HMGB2 – HPLC. Chromatogramm einer RP-C18-Auftrennung, mit der die Reinheit des rek. exprimierten Proteins überprüft wurde. Es wurden 15  $\mu$ l HMGB2-Lösung (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) injiziert und eine Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 ml/min verwendet. Die Absorption bei 214 nm in mAU (milli-absorbance-units) ist gegen die Zeit in min aufgetragen. Der Peak zwischen 52 min und 54 min entspricht dem rek. exprimierten HMGB2. Der 78 min Peak resultierte aus der extremen Veränderung der Fließmittelzusammensetzung am Ende des Laufs.

## 5.2 Charakterisierung des antimikrobiellen Aktivitätsspektrums von HMGB2

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass das aus Colongewebe extrahierte HMGB2 antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* K12 besitzt (Küchler, 2009). Mit dem rekombinant hergestellten HMGB2 sollte nun das Aktivitätsspektrum des Proteins genauer analysiert werden. Dazu wurden verschiedene Bakterien mit HMGB2 behandelt und mit Hilfe

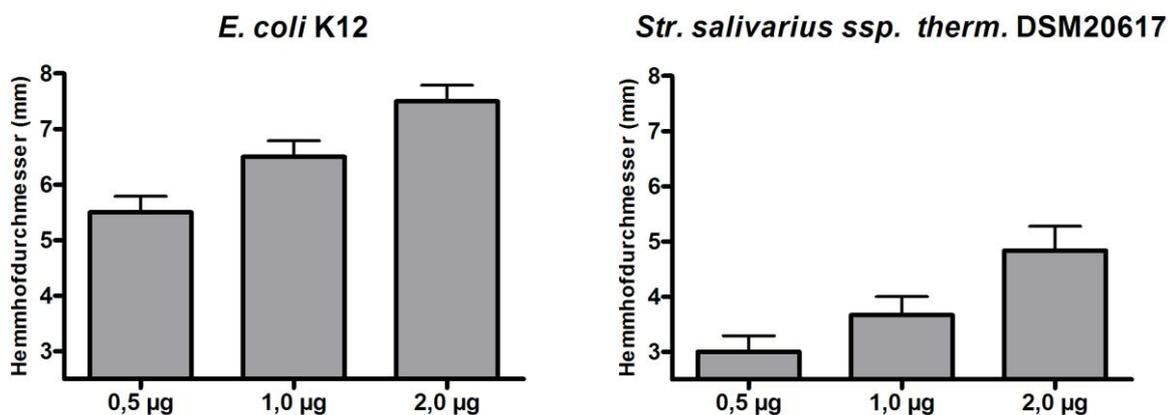
des RDAs auf inhibitorische Effekte untersucht. Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit zu ermitteln wurden 3 Proteinkonzentrationen getestet. In der Abbildung 4 ist ein Ausschnitt eines repräsentativen Coomassie-gefärbten RDA-Gels zu sehen. Bei der Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) ist nur das durch den Biopsy Punch erzeugte Probenloch zu erkennen. Die Positivkontrolle (1 µg Lysozym) hingegen weist einen deutlichen Hemmhof von 8 mm auf, in dem keine Bakterien gewachsen sind. Im unteren Bereich der Abbildung sind die inhibitorischen Effekte von 3 unterschiedlichen Konzentrationen des rekombinant exprimierten HMGB2 zu sehen. In diesem Gel konnten Hemmhöfe von 5 mm, 6 mm und 7 mm gemessen werden.



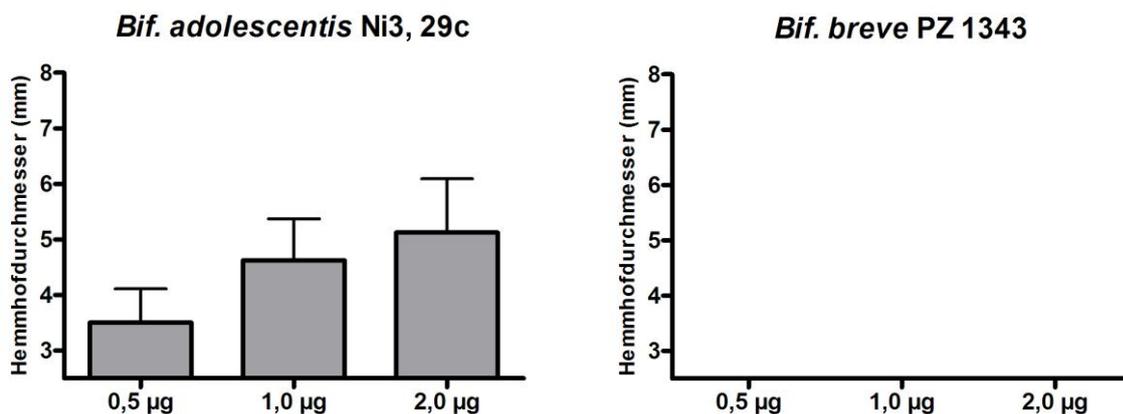
**Abbildung 4** Ausschnitte eines Coomassie-gefärbten RDA-Gels, bei dem 2 Kontrollen und 3 HMGB2-Konzentrationen gegen *E. coli* K12 getestet wurden. Bei der Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) ist nur das durch den Biopsy Punch erzeugte Probenloch zu sehen. Die Positivkontrolle (1 µg Lysozym) zeigt einen Hemmhof von 8 mm und die HMGB2-Konzentrationen Hemmhöfe von 5 mm, 6 mm und 7 mm.

In den Graphen der Abbildungen 5-8 sind die Ergebnisse der RDAs, die bei Messungen gegen verschiedene Bakterien ermittelt werden konnten, zusammengestellt. Die stärkste Aktivität von HMGB2 konnte bei 2 µg, mit einem Hemmhof von über 7 mm, gegen *E. coli* gemessen werden. Dieses Ergebnis verifiziert die Daten, die während meiner Diplomarbeit erhoben wurden. Das Wachstum von *Str. salivarius ssp. thermophilus* und *Bif. adolescentis* wurde

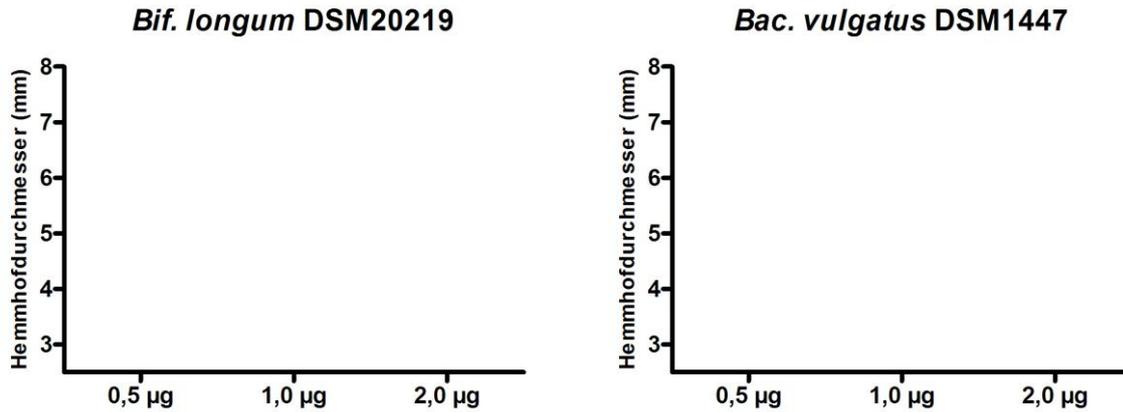
ebenfalls stark durch das rekombinant exprimierte Protein inhibiert. Gegen *Lac. acidophilus* konnte eine schwache und gegen *Lac. fermentum* eine minimale wachstumshemmende Wirkung detektiert werden. Die Bakterien *Bif. breve*, *Bac. vulgatus* und *Bif. longum* zeigten keinen Hemmhof bei den getesteten Konzentrationen und wiesen damit kein reduziertes Wachstum auf. Bei allen Bakterien, die sensitiv auf HMGB2 reagierten, konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung gezeigt werden. Je höher die Proteinkonzentration, desto stärker waren die inhibitorischen Effekte.



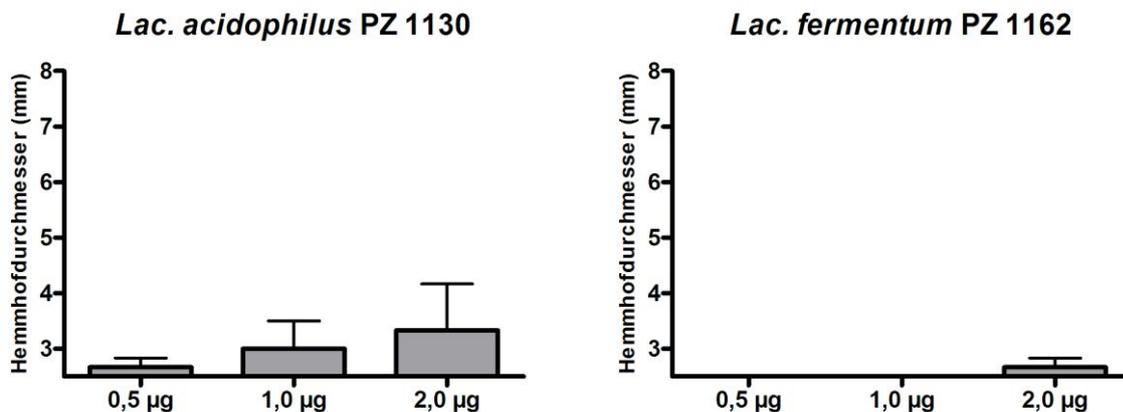
**Abbildung 5** In den Balkendiagrammen sind die Durchmesser der Hemmhöfe dargestellt, die bei der Verwendung von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 2,0 µg rek. HMGB2 in RDAs gegen *E. coli* K12 und *Str. salivarius ssp. therm* DSM20617 gemessen werden konnten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm.



**Abbildung 6** In den Balkendiagrammen sind die Durchmesser der Hemmhöfe dargestellt, die bei der Verwendung von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 2,0 µg rek. HMGB2 in RDAs gegen *Bif. adolescentis* Ni3, 29c und *Bif. breve* PZ 1343 gemessen werden konnten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm.



**Abbildung 7** In den Balkendiagrammen sind die Durchmesser der Hemmhöfe dargestellt, die bei der Verwendung von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 2,0 µg rek. HMGB2 in RDAs gegen *Bif. longum* DSM20219 und *Bac. vulgatus* DSM1447 gemessen werden konnten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm.



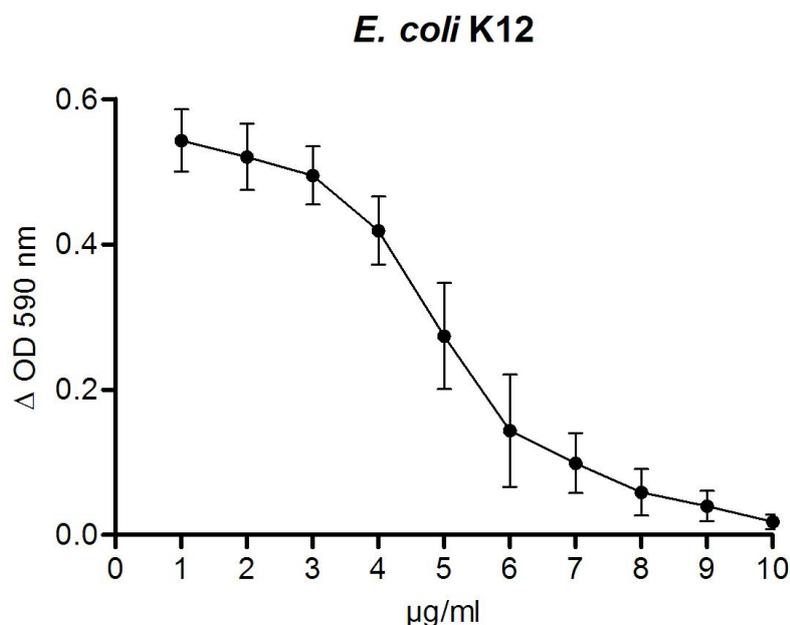
**Abbildung 8** In den Balkendiagrammen sind die Durchmesser der Hemmhöfe dargestellt, die bei der Verwendung von 0,5 µg, 1,0 µg bzw. 2,0 µg rek. HMGB2 in RDAs gegen *Lac. acidophilus* PZ 1130 und *Lac. fermentum* PZ 1162 gemessen werden konnten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm.

## 5.3 Verifizierung der antimikrobiellen Aktivität mittels

### Trübungsassay

Um die mit dem RDA erhobenen Daten der antimikrobiellen Aktivität zu verifizieren wurde ein Trübungsassay verwendet. Bei diesem Assay werden Bakterien in einem Flüssigmedium mit einer Probe behandelt, anschließend wird die OD des Mediums regelmäßig überprüft. Besitzt die Probe antimikrobielle Aktivität werden die Bakterien in ihrem Wachstum gehemmt oder sogar abgetötet und eine durch Bakterienwachstum verursachte Trübung des Mediums bleibt aus. Mit dem Trübungsassay sollte überprüft werden, ob sich die Konzentrationsabhängigkeit und die Aktivität des HMGB2 gegen *E. coli*, die mit dem RDA

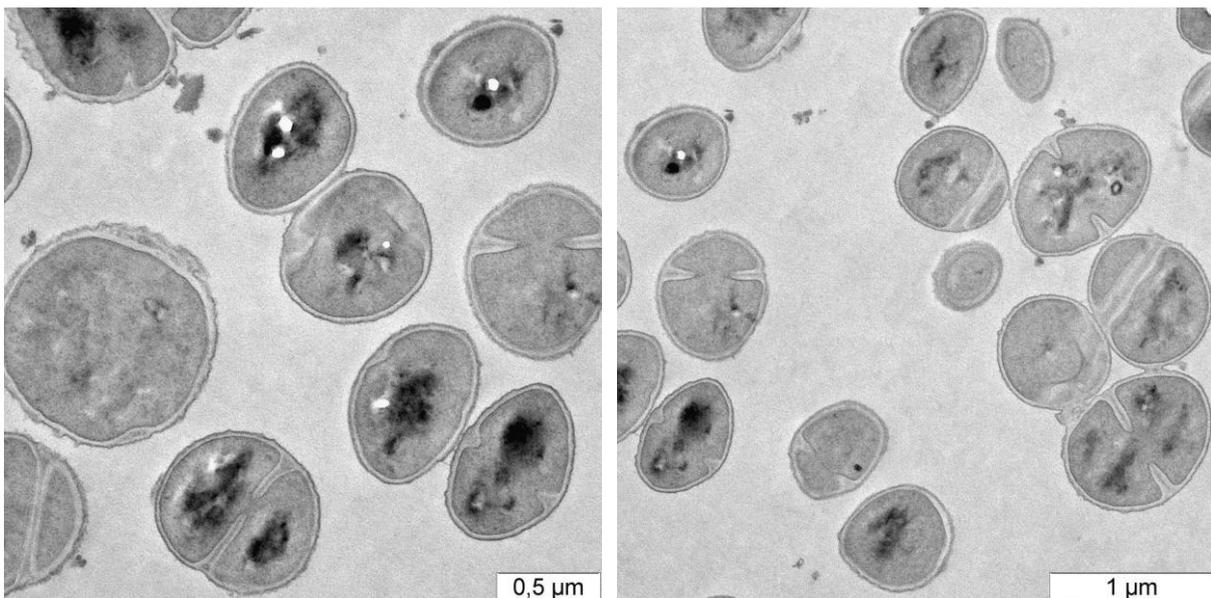
gemessen werden konnten, bestätigen lassen. In Vorversuchen stellte sich der 7 h-Wert als besonders geeignet für die Darstellung der Aktivität heraus. In dem Graph der Abbildung 9 ist das Ergebnis der Trübungsassays zu diesem Zeitpunkt abgebildet. Es ist zu sehen, dass die verschiedenen HMGB2-Konzentrationen das Wachstum von *E. coli* unterschiedlich stark beeinflussen. Wie erwartet konnte auch durch diesen Assay der konzentrationsabhängige Effekt des Proteins detektiert werden. Bei 1-4 µg/ml HMGB2 wurde bereits schwache Aktivität gemessen. Ab einer Konzentration von 5 µg/ml stieg der Effekt auf das Wachstum von *E. coli* stark an. Eventuell wurde hier eine Konzentration erreicht, bei der die Menge des HMGB2 in der Suspension so groß war, dass sich genügend Proteine an die Zellen anlagern konnten um eine effektive Hemmung oder Abtötung der Bakterienzellen zu bewirken. Bei den höchsten Konzentrationen konnte fast keine Trübung der Suspension mehr gemessen werden. Als Positivkontrollen wurden die beiden potenten antimikrobiellen Proteine Lysozym und hBD-3 verwendet. Bei einer Konzentration von 30 µg/ml Lysozym konnte eine  $\Delta$  OD 590 nm von 0,014 und bei 10 µg/ml hBD-3 eine  $\Delta$  OD 590 nm von 0,018 gemessen werden. Die Behandlung der Bakterien mit dem rekombinanten HMGB2 in einer Konzentration von 10 µg/ml führte dazu, dass nach 7 h eine  $\Delta$  OD 590 nm von 0,017 festgestellt wurde. Die durch den Trübungsassay ermittelten Aktivitätswerte von HMGB2 waren damit auf einem Niveau mit den Positivkontrollen. Es ist festzuhalten, dass HMGB2 auch in diesem Assay starke antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* gezeigt hat.



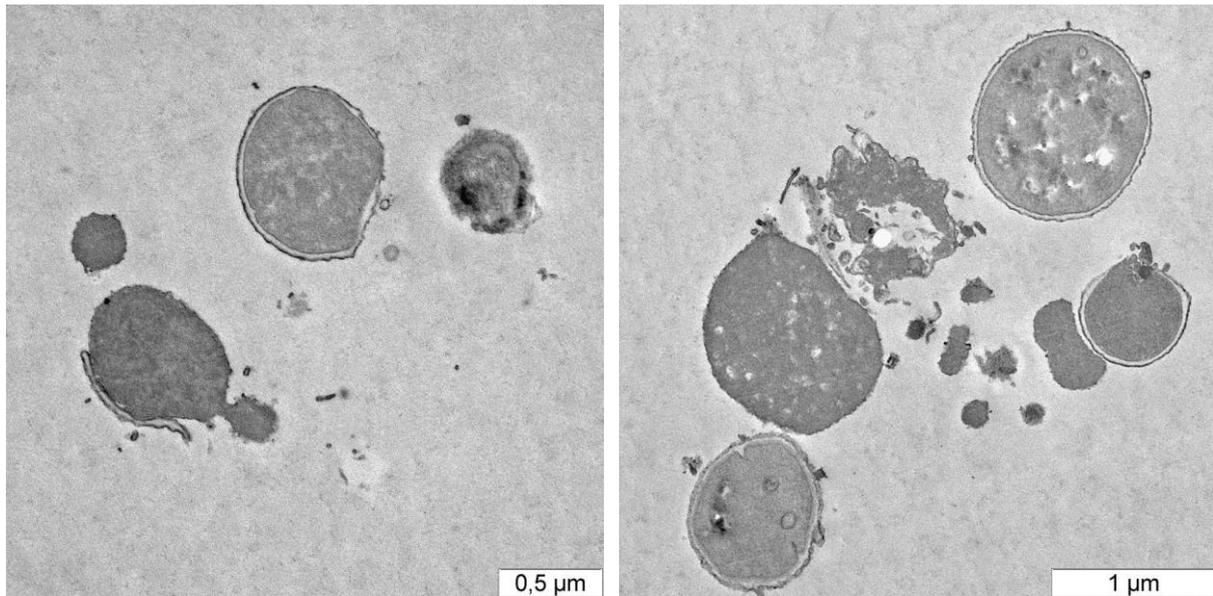
**Abbildung 9** Antimikrobielle Aktivität von verschiedenen Konzentrationen des rek. HMGB2 gegen *E. coli* K12 im Trübungsassay. Es sind die  $\Delta$  OD 590 nm Werte, die 7 h nach Zugabe des 2x TSB-Mediums gemessen werden konnten, abgebildet.

## 5.4 Elektronenmikroskopische Analyse von HMGB2-behandelten *S. aureus*

Um zu untersuchen ob HMGB2 auch gegen pathogene Bakterien Aktivität zeigt, wurden *S. aureus*-Bakterien mit rekombinantem HMGB2 behandelt und anschließend mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Bereits während der Aufarbeitung konnte durch Ausplattieren eines kleinen Teils der Probe auf Columbia Blutagar Platten und durch eine durchflusszytometrische Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität ein vermindertes Wachstum von *S. aureus* festgestellt werden. In den Abbildungen 10 und 11 sind Aufnahmen von unbehandelten und mit HMGB2 behandelten Bakterien zu sehen. Die Zellen der Kontrolle zeigen keine sichtbaren Schäden. Ein Großteil der Bakterien, die mit HMGB2 inkubiert wurden, weist hingegen Veränderungen der Membran auf. Bei einigen Zellen ist die Membran teilweise beschädigt, andere Zellen sind bereits soweit zerstört, dass überhaupt keine Membran mehr zu sehen ist. Die Aufnahmen legen den Schluss nahe, dass HMGB2 bakterizide Eigenschaften besitzt und durch Wirkung auf die Membran das Absterben der Bakterien verursacht. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Bestimmungen der Aktivität und RDAs wurden die antimikrobiellen Effekte des HMGB2 weiter untersucht. Nicht in allen Messungen konnte jedoch antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* detektiert werden. Es war nicht möglich festzustellen, worauf die Unterschiede in der Aktivität gegen dieses Bakterium zurückzuführen waren. Die transmissionselektronischen Aufnahmen zeigen jedoch deutlich, dass HMGB2 *S. aureus* abtöten kann.



**Abbildung 10** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Negativkontrolle, bei der die *S. aureus*-Bakterien anstatt der Proteinlösung mit 50 µl H<sub>2</sub>O inkubiert wurden. Die Zellen weisen keine sichtbaren Schäden auf.

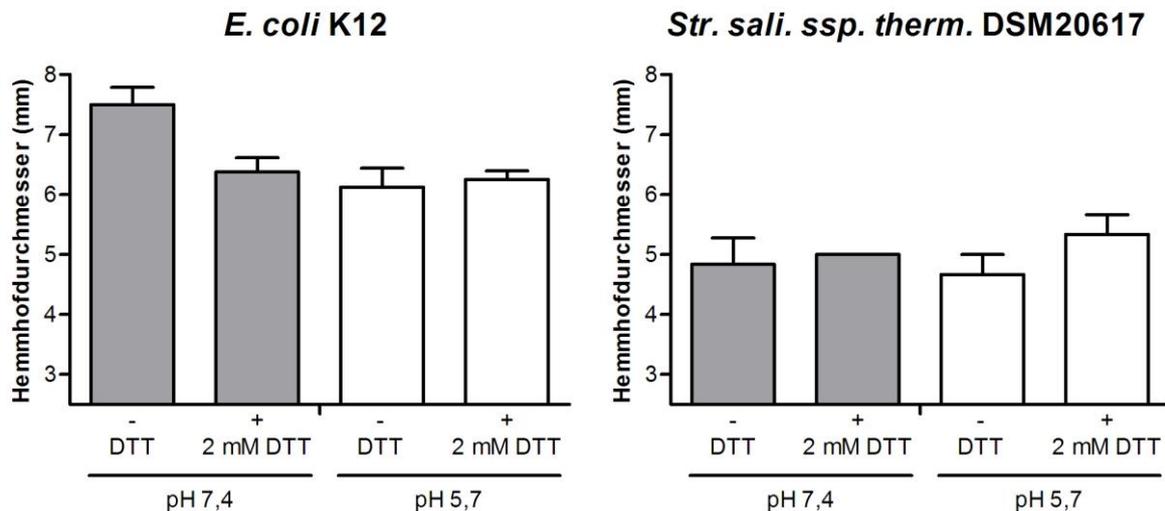


**Abbildung 11** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. aureus*-Bakterien, die mit HMGB2 in einer Konzentration von 260 µg/ml behandelt wurden. Einige der Zellen weisen massive Schäden der Membran auf.

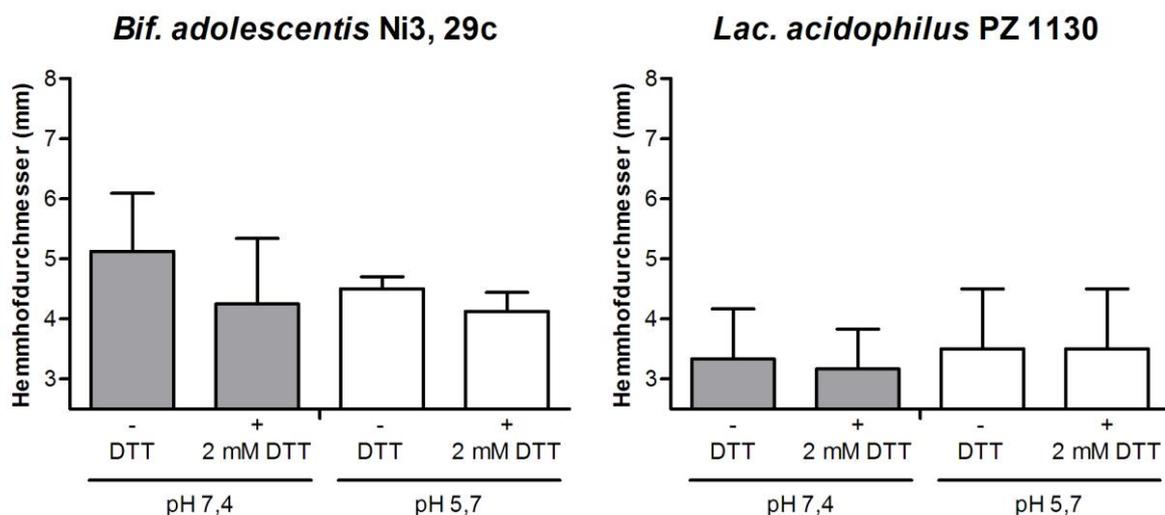
## 5.5 Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität von HMGB2

Wie in der Einleitung beschrieben, variieren die Umgebungsbedingungen, wie der pH-Wert und die Menge des verfügbaren Sauerstoffs sehr stark zwischen den einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (Wilson, 2004) und beeinflussen die Funktionalität von Proteinen. Um einen Effekt der Umgebungsbedingungen auf die antimikrobielle Aktivität von HMGB2 zu untersuchen, wurden Bakterien, die in Vorversuchen sensitiv auf das Protein waren, mit modifizierten RDAs analysiert. Dabei wurden sowohl der Einfluss des pH-Wertes als auch die Auswirkungen eines reduzierenden Milieus untersucht. In den Abbildungen 12 und 13 sind die Durchmesser der Hemmhöfe dargestellt, die bei einer Konzentration von 2 µg/Probenloch und den verschiedenen Bedingungen gemessen werden konnten. Die Messwerte, die bei dem pH von 7,4 detektiert wurden, sind bereits in der Abbildung 5 gezeigt worden. Bei nicht reduzierenden Bedingungen (ohne DTT) und dem pH-Wert von 7,4 ist gegen *E.coli* eine starke Aktivität nachweisbar. Sowohl das Absenken des pH als auch die Generierung eines reduzierenden Milieus wirken sich negativ auf die Aktivität des Proteins aus. Bei *Bif. adolescentis* lässt sich die Minderung der antimikrobiellen Aktivität durch Modifikationen der Umgebung, die von den Startbedingungen (nicht-reduzierend, pH 7,4) abweichen, ebenfalls feststellen. Die Wirkung von HMGB2 auf *Str. salivarius* konnte durch die ersten beiden Änderungen der Umgebung (reduzierend, pH 7,4 und nicht-reduzierend pH 5,7) nicht

beeinflusst werden. Die Etablierung eines reduzierenden Milieus und die Erzeugung eines pH-Wertes von 5,7 bewirkten jedoch eine geringe Aktivitätssteigerung. Bei *Lac. acidophilus* konnten keine großen Unterschiede durch die Modifikationen der Umgebung festgestellt werden. Die getesteten Bedingungen scheinen zwar einen messbaren aber keinen großen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität von HMGB2 zu besitzen.



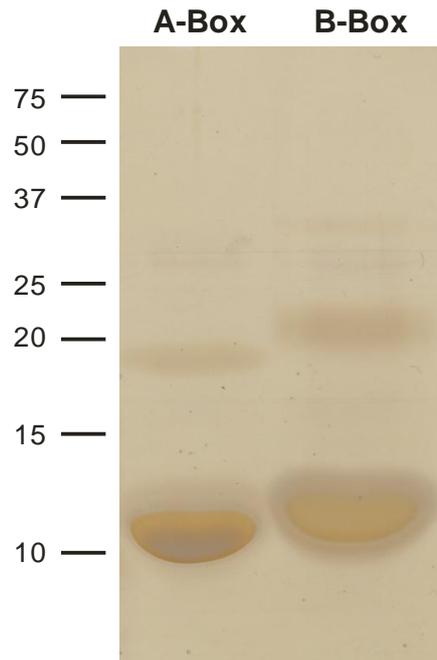
**Abbildung 12** Ergebnisse der RDAs, bei denen der Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Aktivität untersucht wurde. Für die Messungen wurden 2 µg rek. HMGB2 verwendet. Es sind die Größen der Hemmhofdurchmesser dargestellt, die bei pH 7,4 und 5,7 unter reduzierenden Bedingungen (2 mM DTT) und nicht-reduzierenden Bedingungen (0 mM DTT) gegen *E. coli* und *Str. salivarius* gemessen werden konnten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm.



**Abbildung 13** Ergebnisse der RDAs, bei denen der Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Aktivität untersucht wurde. Für die Messungen wurden 2 µg rek. HMGB2 verwendet. Es sind die Größen der Hemmhofdurchmesser dargestellt, die bei pH 7,4 und 5,7 unter reduzierenden Bedingungen (2 mM DTT) und nicht-reduzierenden Bedingungen (0 mM DTT) gegen *Bif. adolescentis* und *Lac. acidophilus* gemessen werden konnten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm.

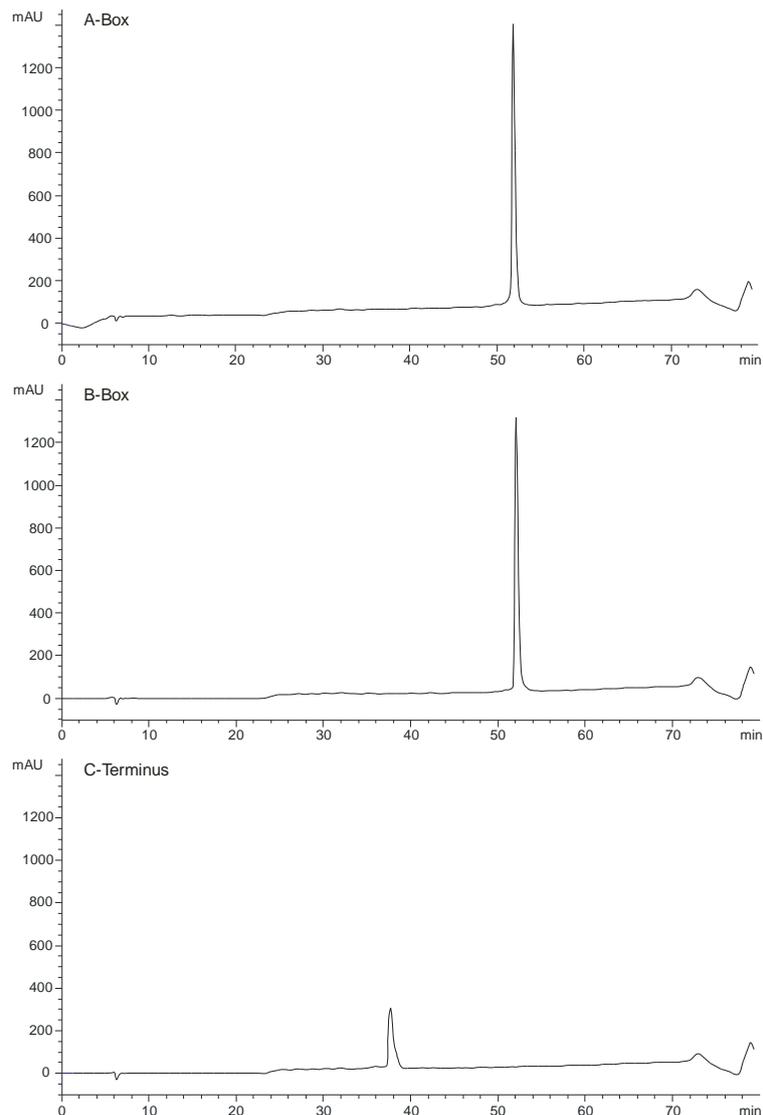
## **5.6 Identifizierung der für die antimikrobielle Aktivität essentiellen Bereiche von HMGB2**

Die vorherigen Abschnitte beschrieben das Spektrum der antimikrobiellen Aktivität von HMGB2 sowie den Einfluss der Umgebung auf dessen antimikrobielle Aktivität. Da diese Funktion erst vor kurzem entdeckt wurde gibt es keine Informationen darüber, welche Bereiche des Proteins für die Aktivität essentiell sind. Durch die rekombinante Expression der zwei HMG-Box-Domänen sowie des sauren C-Terminus und einer anschließenden Analyse der Aktivität sollte geklärt werden, welcher Bereich von HMGB2 für diese Funktion entscheidend ist. Durch die Erfahrungen, die bei der Expression des kompletten HMGB2 gemacht wurden und der Verwendung des codonoptimierten Gens konnten die 3 Peptide in relativ kurzer Zeit hergestellt werden. Es ist zu beachten, dass die Peptide aufgrund der verwendeten Primer nicht exakt den Bereichen, die in dem schematischen Aufbau (Abbildung 1) dargestellt sind, entsprechen. Die exprimierten Peptide umfassen jedoch die Abschnitte nach denen sie bezeichnet wurden (siehe Anhang). Die Expression und Aufreinigung der A-Box- und B-Box-Peptide erfolgte ohne große Schwierigkeiten. Die Klonierungsschritte und die Expression des C-Terminus-Peptids funktionierten ebenfalls problemlos. Das Fusionsprotein konnte mit Coomassie-gefärbten SDS-Gelen mit einer Doppelbande nachgewiesen werden. Nach dem Verdau des Fusionsproteins mit der SUMO-Protease und den abschließenden Aufreinigungsschritten war das C-Terminus-Peptid jedoch nicht mehr in den SDS-Gelen detektierbar. Mit Hilfe eines Proteinsassays nach Smith wurde aber eine Konzentration des Peptids ermittelt. Das A-Box-Peptid konnte mit einer Größe von circa 12 kDa (erwartet 9,8 kDa, ExPASy ProtParam) und das B-Box-Peptid bei circa 13 kDa (erwartet 10,6 kDa, ExPASy ProtParam) nachgewiesen werden. Es war jeweils eine schwache Bande bei ungefähr doppelter Größe zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich, wie beim kompletten HMGB2-Protein, um Dimere handelte, da die Banden mit höheren DTT-Konzentrationen im Puffer schwächer wurden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 14** Ausschnitt eines mit Silbernitrat-gefärbten 18 %igen SDS-Gels, mit dem die Reinheit des rek. exprimierten A-Box- und B-Box-Peptids überprüft wurde. Es wurde der Probenpuffer 2 verwendet und jeweils 3 µg Peptid eingesetzt.

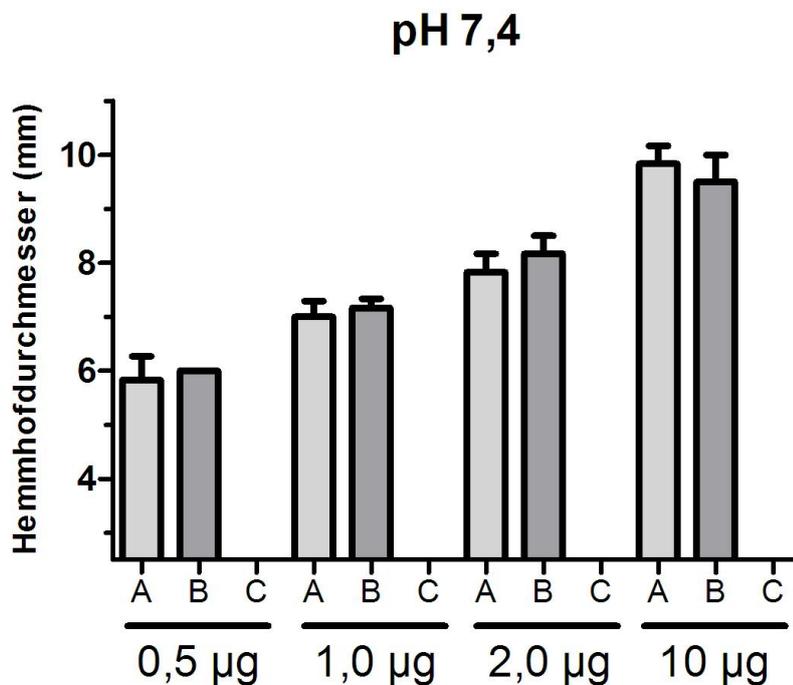
Um die hohe Reinheit zu bestätigen wurden jeweils 15 µg der Peptide mit einer RP-C18-Säule aufgetrennt. Die Chromatogramme dieser Auftrennungen sind in der Abbildung 15 zu sehen. Die A-Box- und B-Box-Peptide sind in ihrer Größe und AS-Zusammensetzung sehr ähnlich und verlassen beide nach 52 min und einer AcN-Konzentration von ungefähr 34 % die Säule. Das C-Terminus-Peptid ist nach 37 min und einer AcN-Konzentration von circa 20 % am Detektor nachweisbar. Alle 3 Chromatogramme enthalten einen einzelnen Peak und verdeutlichen damit die hohe Reinheit der 3 rekombinant exprimierten Peptide.



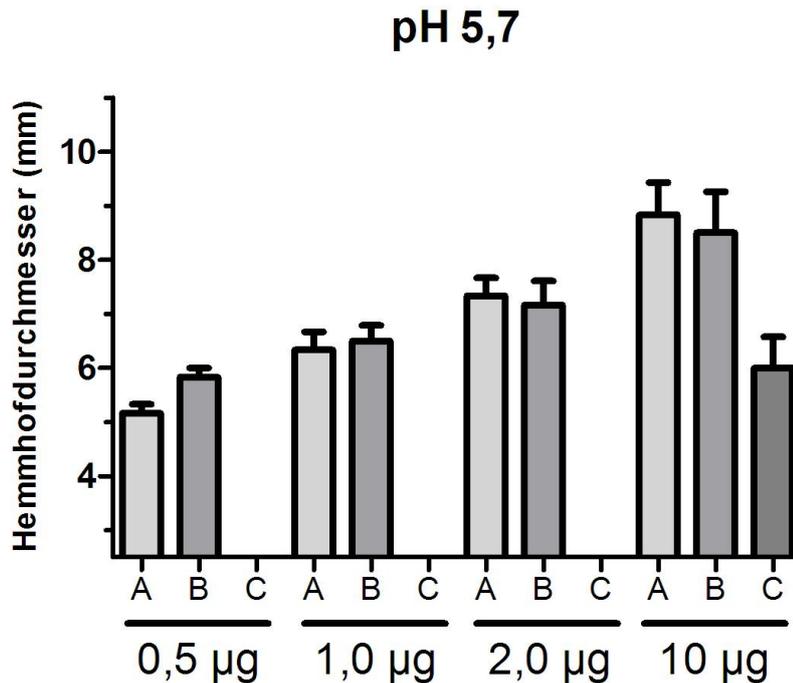
**Abbildung 15** Chromatogramme von RP-C18-Auftrennungen, mit denen die Reinheit des rek. exprimierten A-Box-, B-Box- und C-Terminus-Peptids überprüft wurden. Es wurden 15  $\mu\text{l}$  Peptidlösung ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) injiziert und eine Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 ml/min verwendet. Die Absorption wurde bei 214 nm gemessen und ist in mAU gegen die Zeit in min aufgetragen. Die Peaks bei 52 min entsprechen den A-Box- bzw. B-Box-Peptiden, das C-Terminus-Peptid eluiert bei 37 min deutlich früher. Die 78 min Peaks resultierten aus den extremen Veränderungen der Fließmittelzusammensetzung am Ende der Läufe und sind von der Probenzusammensetzung unabhängig.

Nachdem die A-Box, B-Box und der C-Terminus rekombinant exprimiert wurden, konnten RDAs mit den Peptiden gegen *E. coli* K12 durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abbildungen 16 und 17 zusammengestellt. Sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 5,7 konnte starke antimikrobielle Aktivität des A-Box- und B-Box-Peptids nachgewiesen werden. Analog der Versuche mit dem kompletten HMGB2-Protein wurde eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt. Mit dem C-Terminus-Peptid konnte keine Aktivität bei pH 7,4 und nur bei der höchsten Konzentration ( $10\mu\text{g}/\text{Probenloch}$ ) bei pH 5,7 eine antibiotische Wirkung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die beiden DNA-

Bindedomänen, die A-Box und B-Box, für die antimikrobielle Aktivität verantwortlich sind. Dieses Ergebnis war unerwartet, da bei HMGB1 der C-Terminus für diese Funktion maßgeblich zu sein scheint (Gong et al., 2009). Um die erhobenen Daten zu verifizieren und eventuelle Probleme, die durch die fehlende Nachweisbarkeit in den SDS-Gelen resultierten, auszuschließen wurde der C-Terminus weiter untersucht. Dazu wurde die Synthese der letzten 22 AS des C-Terminus bei der Firma EMC microcollections in Auftrag gegeben und das Peptid mit dem RDA auf Aktivität gegen *E. coli* K12 überprüft. Es wurden Messungen bei den pH-Werten 7,4 und 5,7 durchgeführt und Konzentrationen von 2 µg sowie 10 µg pro Probenloch getestet. Das Peptid zeigte in den RDAs keine Aktivität. Offensichtlich sind die HMG-Box A und B in der Lage das Wachstum von Bakterien negativ zu beeinflussen, der C-Terminus besitzt diese Eigenschaft nicht.



**Abbildung 16** Antimikrobielle Aktivität des A-Box-, B-Box- und C-Terminus-Peptids gegen *E. coli* K12. Es sind die Hemmhofdurchmesser in mm gezeigt, die bei der Verwendung der entsprechenden Peptidmengen und dem pH-Wert von 7,4 im RDA gemessen werden konnten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm.

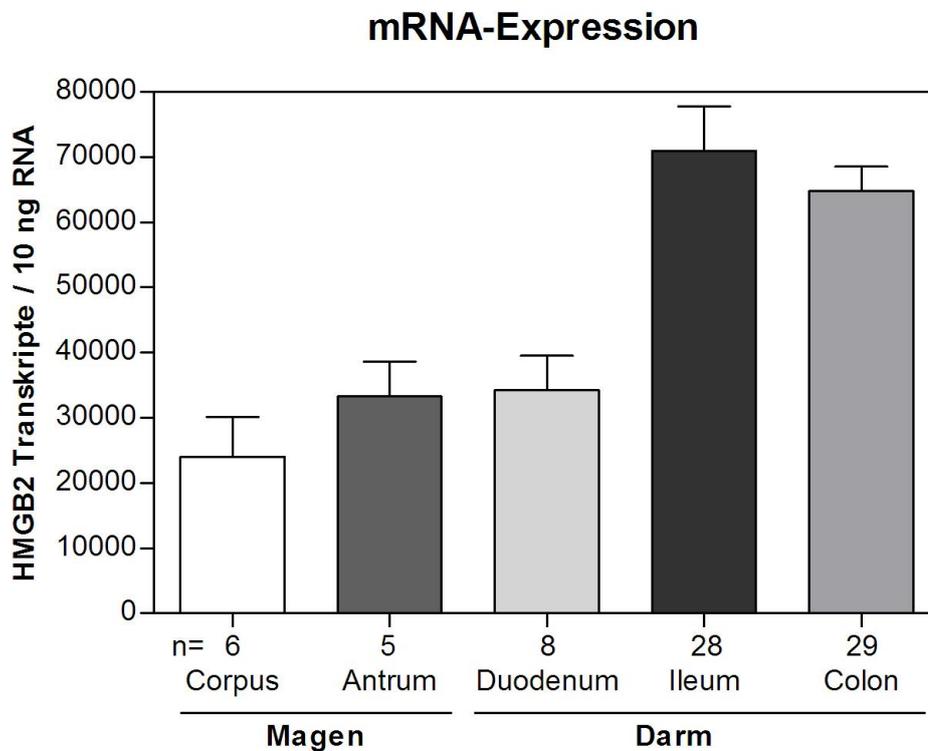


**Abbildung 17** Antimikrobielle Aktivität des A-Box-, B-Box- und C-Terminus-Peptids gegen *E.coli* K12. Es sind die Hemmhofdurchmesser in mm gezeigt, die bei der Verwendung der entsprechenden Peptidmengen und dem pH-Wert von 5,7 im RDA gemessen werden konnten. Das Probenloch besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm.

## 5.7 mRNA-Expression von HMGB2

Da in der Literatur nur wenige Daten zur Expression von HMGB2 zu finden sind und sich diese hauptsächlich auf Untersuchungen in Mäusen stützen, wurde die Expression im humanen Gastrointestinaltrakt genauer untersucht. Mit Hilfe von quantitativen Real-time PCRs an einem LightCycler 480 wurde die mRNA-Expression von HMGB2 in verschiedenen Gewebeabschnitten ermittelt. Da auch Haushaltsgene gewebeabhängig unterschiedliche Expressionslevel aufweisen, wurde auf eine Normalisierung bei dem Vergleich der Abschnitte verzichtet. Die in der Abbildung 18 angegebenen Kopienzahlen wurden mit Hilfe einer Standardkurve errechnet. In den untersuchten Magenabschnitten Corpus und Antrum konnten im Durchschnitt 24001 beziehungsweise 33260 Transkripte pro 10 ng Gesamt-RNA gemessen werden. Die Expression im Duodenum war mit durchschnittlich 34237 Transkripten pro 10 ng Gesamt-RNA auf einem ähnlichen Level. In den beiden anderen untersuchten Darmabschnitten wurden deutlich höhere Werte detektiert. So konnten im Ileum und Colon eine Expression von durchschnittlich 70923 beziehungsweise 64803 Transkripten pro 10 ng Gesamt-RNA gemessen werden. Festzuhalten ist, dass mit 24001 bis 70923

Transkripten pro 10 ng Gesamt-RNA hohe HMGB2-Expressionswerte im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden konnten.



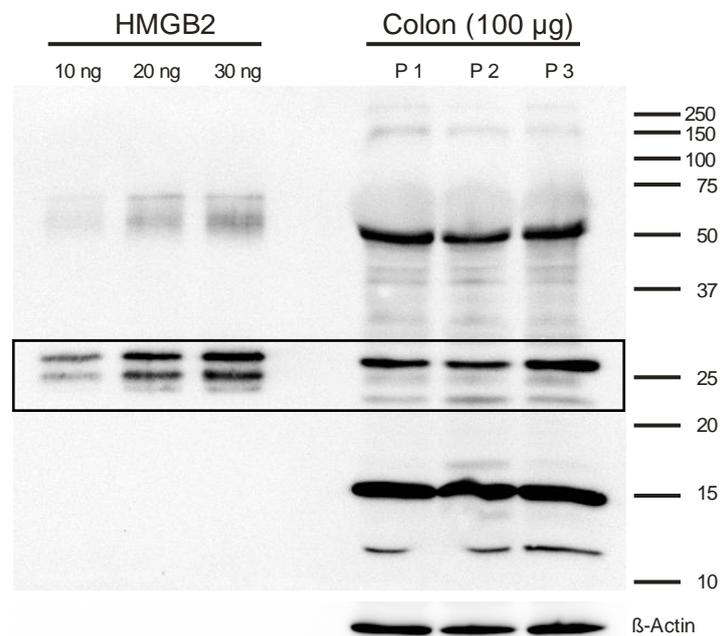
**Abbildung 18** mRNA-Expression von HMGB2 im Gastrointestinaltrakt. Dargestellt sind die ermittelten HMGB2-Transkripte pro 10 ng Gesamt-RNA, die in Corpus, Antrum, Duodenum, Ileum sowie Colon gemessen werden konnten. Außerdem ist die Anzahl (n) der Proben pro Gruppe angegeben.

## 5.8 Proteinexpression von HMGB2

### 5.8.1 Westernblot

Um die Expression auf Proteinebene zu untersuchen wurden Westernblots mit einem HMGB2-spezifischem Antikörper durchgeführt. In der Abbildung 19 ist ein Blot mit 3 Colon-Proteinextrakten, die aus dem Gewebe von verschiedenen Patienten isoliert wurden, dargestellt. Um die Menge des HMGB2 im Extrakt abschätzen und das Laufverhalten zwischen dem extrahierten und exprimierten Protein vergleichen zu können, wurden auf der linken Seite zusätzlich 3 unterschiedliche Konzentrationen des rekombinant exprimierten HMGB2 aufgetragen (bereits in Abbildung 2 B gezeigt). Es ist zu sehen, dass bei den Colonextrakten im Westernblot eine Bande bei ungefähr 25 kDa zu erkennen ist, bei der es sich wahrscheinlich um das HMGB2-Protein handelt. Die Bande befindet sich auf der Höhe der Doppelbande des rekombinant exprimierten Proteins, kann jedoch keiner der beiden

Banden exakt zugeordnet werden. Diese minimalen Abweichungen sind eventuell auf zusätzliche Modifikationen des Proteins in den humanen Zellen zurückzuführen. Für das HMGB2-Protein wurden bereits verschiedene Phosphorylierungen und Acetylierungen beschrieben (siehe UniProt Datenbank, P26583). Diese Modifikationen könnten die kleinen Unterschiede im Laufverhalten zwischen dem rekombinant exprimierten und dem aus Gewebe extrahierten Protein im Gel begründen. Neben der HMGB2-Bande ist ein potentielles Dimer bei doppelter Größe zu erkennen. Wie beim rekombinanten Protein konnte auch diese Bande durch Erhöhung der reduzierenden Bestandteile des Probenpuffers abgeschwächt, aber nicht vollständig entfernt werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich sind zwei Banden bei 15 kDa und ungefähr 12 kDa nachzuweisen. Diese Banden waren bei den durchgeführten Blots mit unterschiedlicher Intensität wahrzunehmen, eventuell handelte es sich um Abbauprodukte des HMGB2-Proteins. Außerdem könnten die beiden Banden verkürzte HMGB2-Varianten darstellen. Da bei den aus dem Gewebe extrahierten Proben zusätzliche Banden zu sehen sind, ist eine Aussage über die HMGB2-Menge durch einen Vergleich mit dem Standard nicht einfach. Es ist jedoch eindeutig, dass die HMGB2-Bande und Dimerbande in ihrer Intensität, den 30 ng Wert des Standards übersteigen.

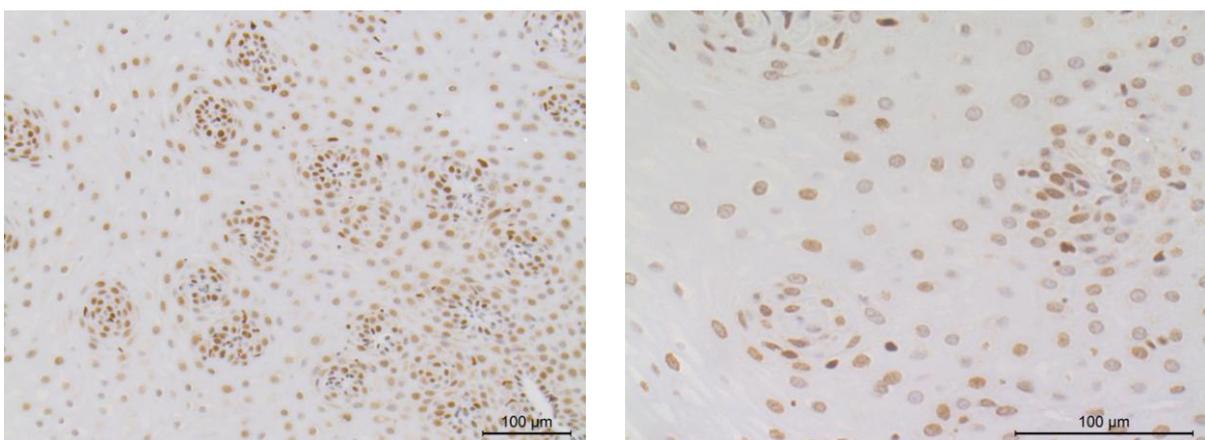


**Abbildung 19** Westernblot mit HMGB2-spezifischem Antikörper. Auf der linken Seite sind 3 verschiedene Konzentrationen des rek. HMGB2 und auf der rechten Seite 3 Colon-Proteinextrakte aufgetragen worden. Es wurde ein 12 %iges Gel und der Probenpuffer 1 verwendet.

## 5.8.2 Immunhistochemie

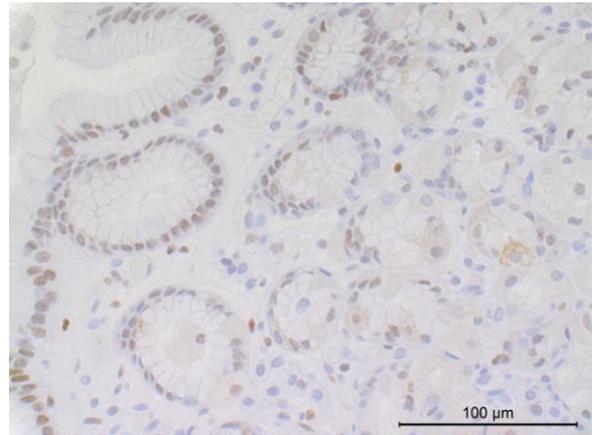
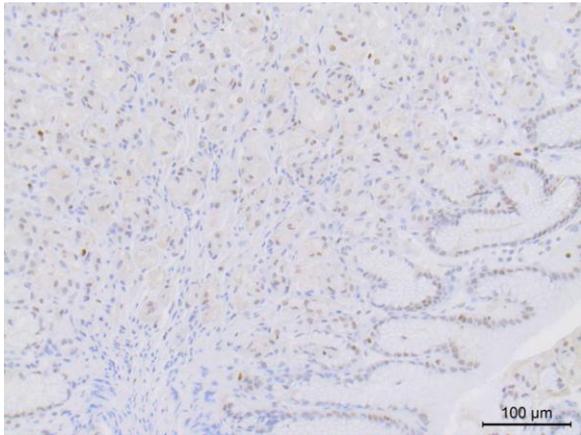
Zusätzlich zu den Westernblots wurden immunhistochemische Färbungen mit einem HMGB2-spezifischem Antikörper durchgeführt. Neben den Gewebeabschnitten, die mit dem LightCycler auf mRNA-Expression untersucht wurden, konnten auch Ösophagus-Schnitte angefertigt und ebenfalls untersucht werden. Es wurden jeweils 3 Schnitte pro Gewebe, die verschiedenen Patienten entnommen wurden, hergestellt und gefärbt. Leider variierte die Färbeintensität zwischen den Schnitten eines Gewebes teilweise etwas. In den Abbildungen 20 - 25 sind daher repräsentative Aufnahmen der Schnitte mit jeweils 2 Vergrößerungen zu sehen. Braune Farbe kennzeichnet Bereiche, in denen die Peroxidase des sekundären Antikörpers das DAB umgesetzt hat und damit die Präsenz des HMGB2-Proteins nachweisbar ist. Es ist zu sehen, dass das Protein in allen untersuchten Geweben detektiert werden konnte. HMGB2 war sowohl in Zellen des Epithels als auch in den diffus verteilten Entzündungszellen nachweisbar. Das Protein war in allen Geweben im Nukleus zu detektieren. Dieses Ergebnis unterstreicht die essentiellen Funktionen des HMGB2 im Zellkern. In den Abschnitten Ileum, Colon und Duodenum war das Protein jedoch auch im Zytoplasma der Epithelzellen detektierbar. Eine besonders intensive Färbung des Zytoplasmas konnte im Duodenum festgestellt werden. HMGB2 war damit nicht nur auf mRNA-Ebene nachweisbar, sondern konnte auch in allen untersuchten Geweben auf Protein-Ebene detektiert werden.

### Ösophagus



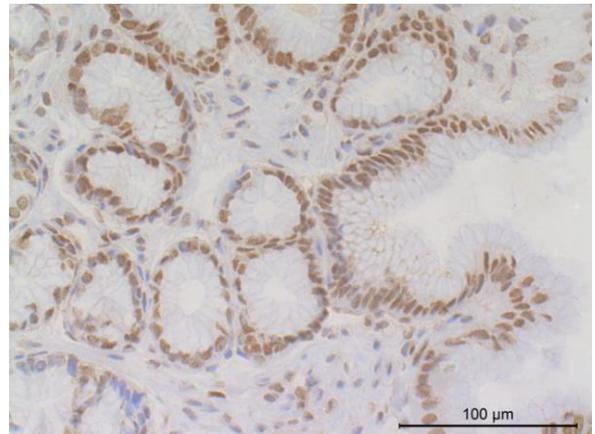
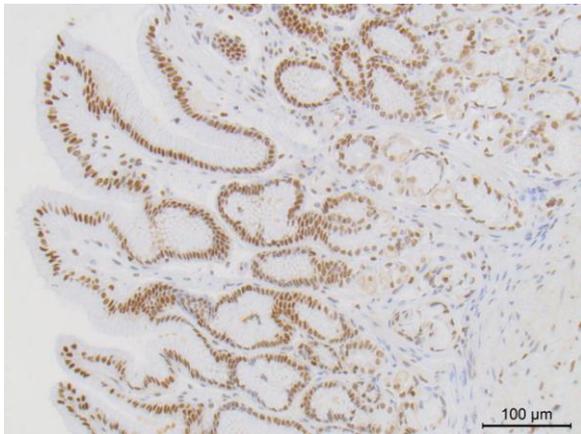
**Abbildung 20** Immunhistochemische Färbungen von Ösophagus-Schnitten mit HMGB2-spezifischem Antikörper. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## Corpus



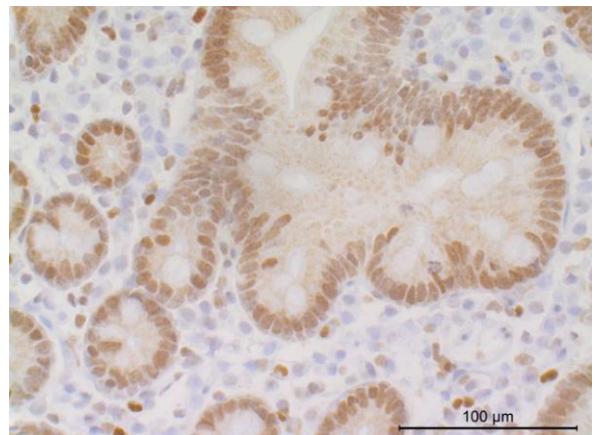
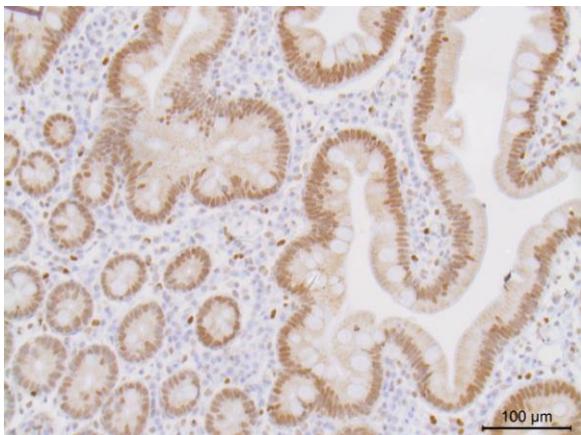
**Abbildung 21** Immunhistochemische Färbungen von Corpus-Schnitten mit HMGB2-spezifischem Antikörper. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## Antrum



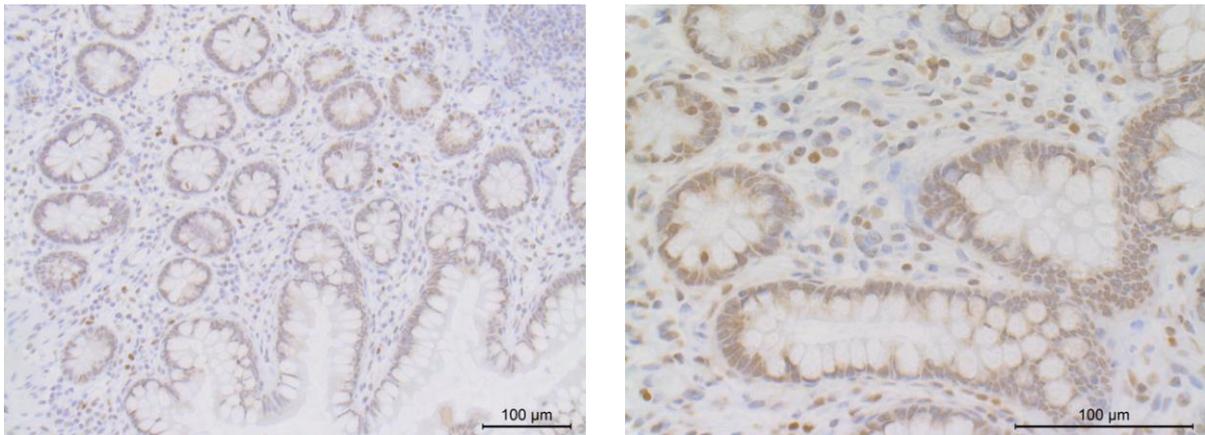
**Abbildung 22** Immunhistochemische Färbungen von Antrum-Schnitten mit HMGB2-spezifischem Antikörper. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## Duodenum



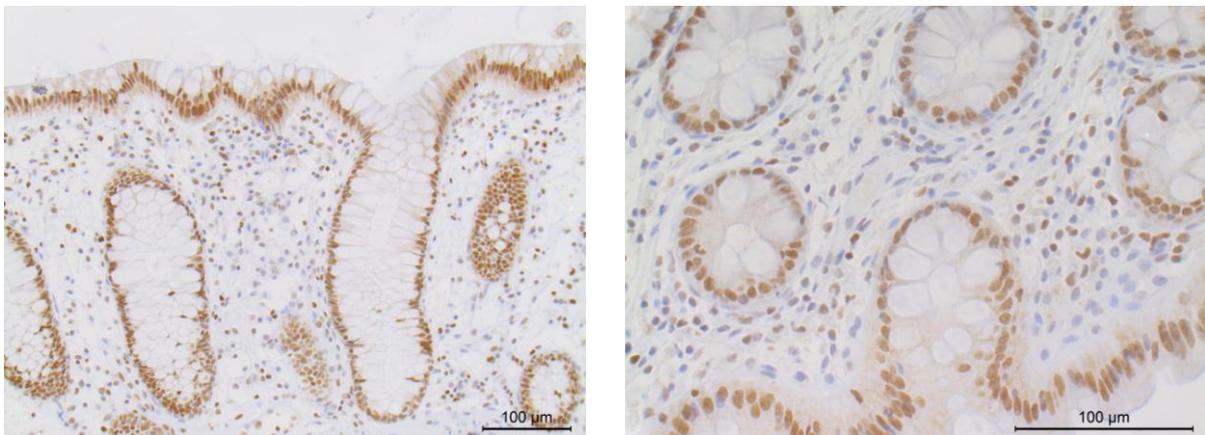
**Abbildung 23** Immunhistochemische Färbungen von Duodenum-Schnitten mit HMGB2-spezifischem Antikörper. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## Ileum



**Abbildung 24** Immunhistochemische Färbungen von Ileum-Schnitten mit HMGB2-spezifischem Antikörper. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## Colon



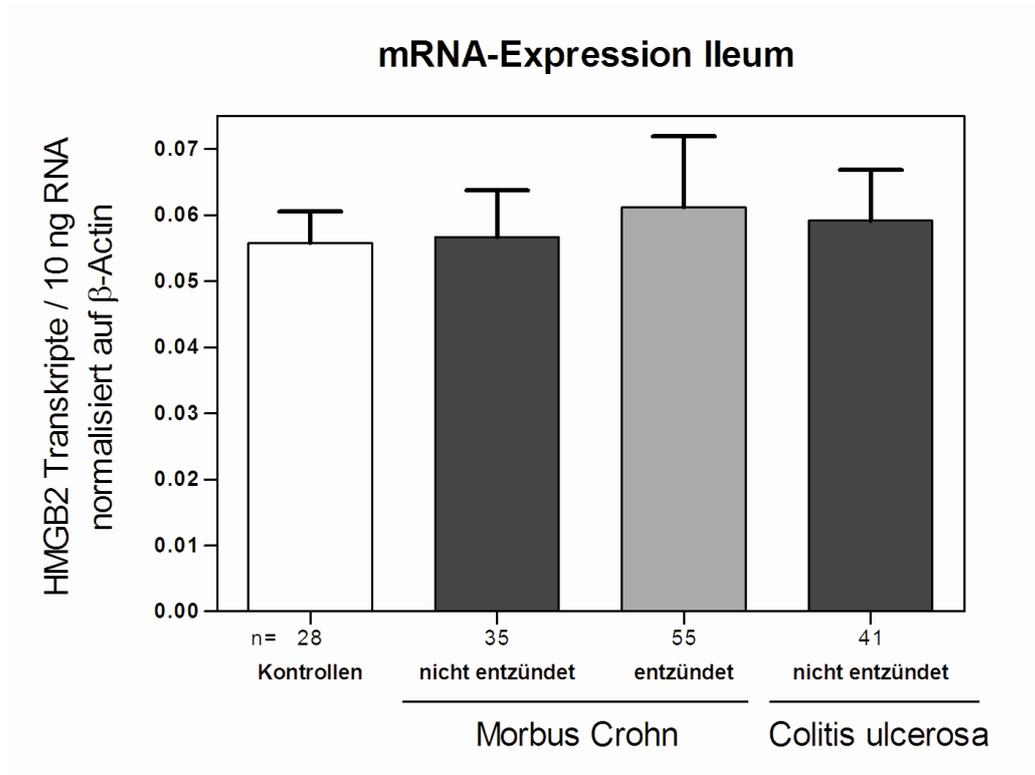
**Abbildung 25** Immunhistochemische Färbungen von Colon-Schnitten mit HMGB2-spezifischem Antikörper. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## 5.9 Expression von HMGB2 bei CED

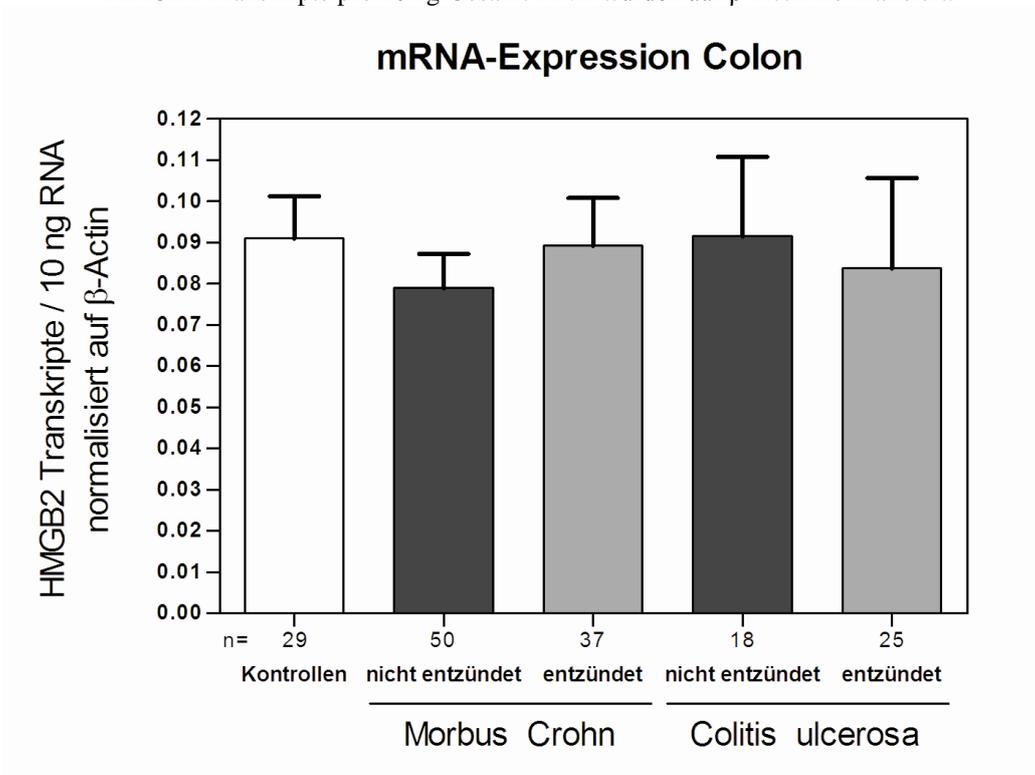
### 5.9.1 mRNA-Expression von HMGB2 bei CED

Da eine gestörte Expression von Defensinen bereits mit CED assoziiert werden konnte (Elphick et al., 2008; Wehkamp et al., 2008), wurde überprüft ob bei HMGB2 ebenfalls Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene zwischen Patienten mit CED und Kontrollpatienten festzustellen sind. Um eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Gruppen innerhalb der Gewebeabschnitte zu gewährleisten, wurden die Messwerte auf die jeweilige Kopienzahl des Haushaltsgens  $\beta$ -Actin normalisiert. In den Abbildungen 26 und 27 ist deutlich zu sehen, dass keine signifikanten Unterschiede in der Expression von HMGB2

zwischen Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn sowie Colitis ulcerosa festgestellt werden konnten.



**Abbildung 26** mRNA-Expression von HMGB2 im Ileum bei Kontrollen und Patienten mit CED. Die HMGB2 Transkripte pro 10 ng Gesamt-RNA wurden auf  $\beta$ -Actin normalisiert.

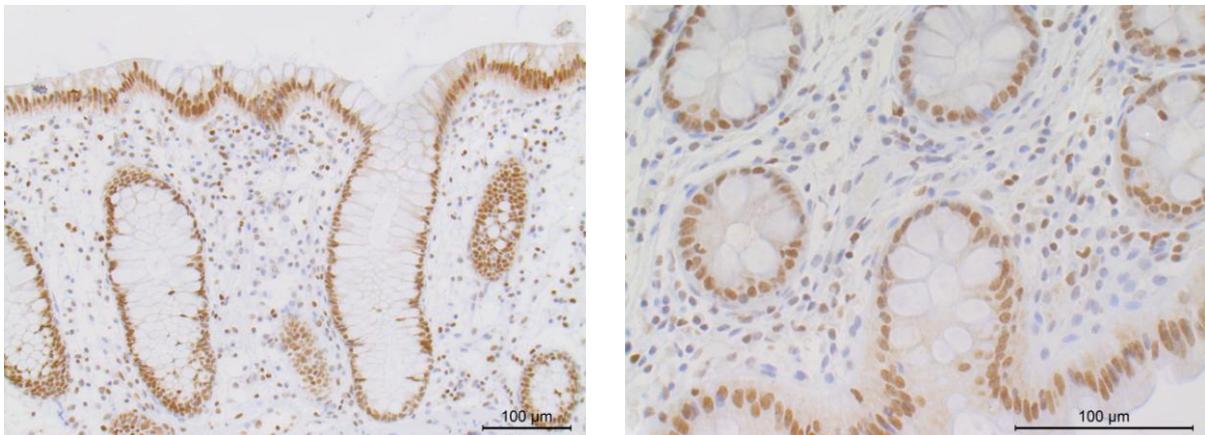


**Abbildung 27** mRNA-Expression von HMGB2 im Colon bei Kontrollen und Patienten mit CED. Die HMGB2 Transkripte pro 10 ng Gesamt-RNA wurden auf  $\beta$ -Actin normalisiert.

### 5.9.2 Proteinexpression von HMGB2 bei CED

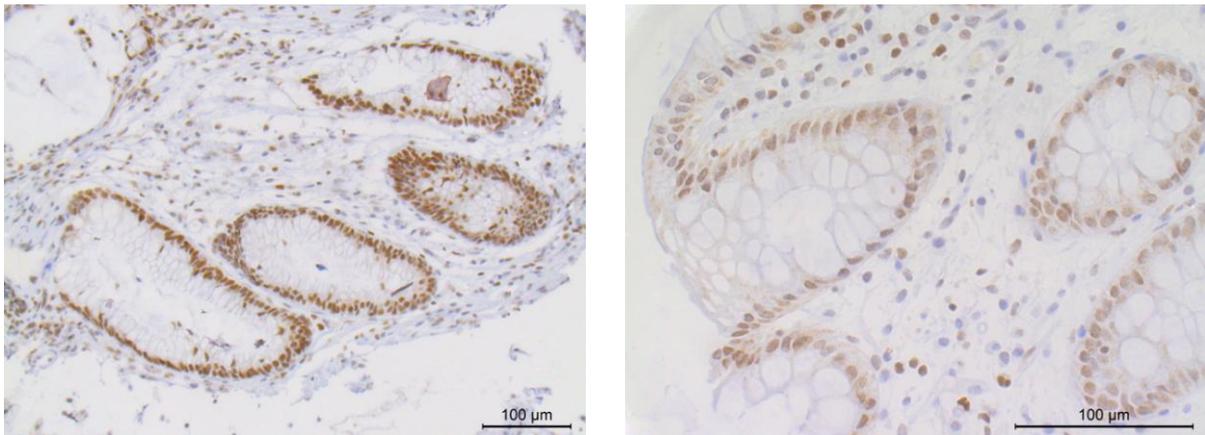
In der mRNA-Expression von HMGB2 konnten keine Unterschiede zwischen CED-Patienten und Kontrollen festgestellt werden. Da jedoch die Regulation der Expression auf verschiedenen Ebenen erfolgen kann und die mRNA-Menge nicht zwangsläufig mit der Proteinmenge korrelieren muss, erfolgte eine semiquantitative Analyse der Proteinexpression durch immunhistochemische Färbungen. Es wurden 3 Schnitte pro Gruppe hergestellt und untersucht. Die Intensität der Färbungen innerhalb einer Gruppe wiesen auch bei diesen Analysen Unterschiede auf. In den Abbildungen 28, 29 und 30 sind daher repräsentative Aufnahmen mit jeweils 2 Vergrößerungen enthalten. Die Bilder des gesunden Colons wurden bereits in Abschnitt 5.8.2 gezeigt. Es ist eine Färbung von Epithel- und Entzündungszellen zu sehen, mit starker Intensität im Nukleus und einer schwachen Intensität im Zytoplasma. Analog zu den Daten der mRNA-Expression lassen sich auch durch diese Färbungen keine Unterschiede in der Proteinexpression im Colon nachweisen. Das Ergebnis erlaubt die Hypothese, dass HMGB2 wahrscheinlich keine entscheidende Rolle in der Entstehung von CED spielt.

#### Colon – gesund



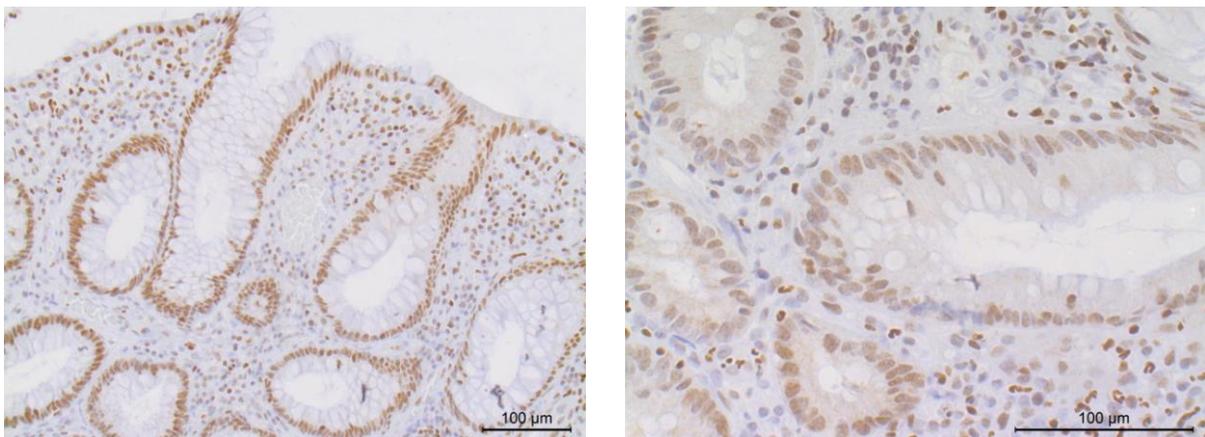
**Abbildung 28** Immunhistochemische Färbungen von Colongewebe, das gesunden Kontrollpatienten entnommen und mit HMGB2-spezifischem Antikörper behandelt wurde. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## Colon – Morbus Crohn



**Abbildung 29** Immunhistochemische Färbungen von Colongewebe, dass Morbus Crohn-Patienten entnommen und mit HMGB2-spezifischem Antikörper behandelt wurde. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## Colon – Colitis ulcerosa

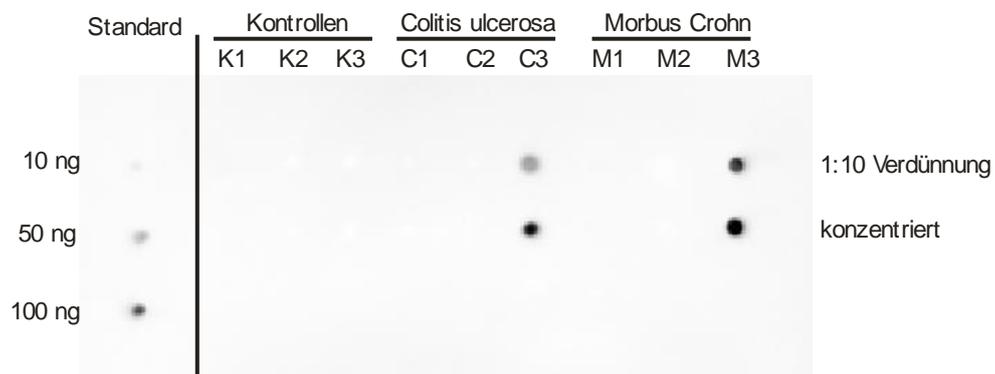


**Abbildung 30** Immunhistochemische Färbungen von Colongewebe, dass Colitis ulcerosa-Patienten entnommen und mit HMGB2-spezifischem Antikörper behandelt wurde. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20x und 40x aufgenommen.

## 5.10 Nachweisbarkeit von HMGB2 im Stuhl

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte Vitali *et al.* 2011 HMGB1 mit Westernblots in Stuhl-Extrakten von Patienten mit CED nachweisen (Vitali et al., 2011). Da HMGB1 und HMGB2 sehr ähnlich sind, lag es nahe zu überprüfen ob HMGB2 ebenfalls im Stuhl von CED-Patienten detektierbar ist. Um dies zu untersuchen wurden Extrakte aus Stuhlproben von jeweils 3 Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie Kontrollpatienten hergestellt. Eigentlich sollte das Protein durch Westernblots analysiert werden. Leider waren bei den Blots nur Banden im Bereich der Geltaschen zu detektieren. Dies lässt darauf schließen, dass das Protein nicht richtig im Gel aufgetrennt wurde und eventuell an andere Komponenten

gebunden hatte. Daraufhin wurden die Proben mit dem methodisch deutlich einfacheren Dot blot, bei dem Proben direkt auf eine Membran pipettiert werden, untersucht. Die Abbildung 31 zeigt einen Blot bei dem 9 Stuhl-Proteinextrakte analysiert wurden. Es ist zu sehen, dass in keiner der Kontrollen HMGB2 nachweisbar war, jedoch in jeweils einer CU (C3) und MC Probe (M3) ein Signal zu detektieren war. Bei C3 und M3 zeigten sowohl die unverdünnten Proben als auch die Verdünnungen intensive Signale, welche über dem 100 ng-Wert des Standards lagen. HMGB2 konnte zwar nicht in allen Extrakten, jedoch in einzelnen CU- und MC-Proben nachgewiesen werden.



**Abbildung 31** Dot blot, bei dem Stuhl-Proteinextrakte auf die Existenz des HMGB2-Proteins mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers untersucht wurden. Auf der linken Seite wurden 3 verschiedene Konzentrationen des rek. HMGB2 und auf der rechten Seite Proteinextrakte, die aus dem Stuhl von Kontroll-, Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten gewonnen wurden, in 2 Konzentrationen getestet.

## 6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Daten zur antimikrobiellen Aktivität des HMGB2-Proteins erhoben werden. Neben einer Analyse des Aktivitätsspektrums wurden die Expression in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes und eine mögliche Veränderung der Expression in CED-Patienten untersucht. Im Folgenden werden einige verwendete Methoden und interessante Ergebnisse diskutiert.

### 6.1 Antimikrobielle Aktivität von HMGB2

Um das Aktivitätsspektrum von HMGB2 zu charakterisieren, wurde das Protein rekombinant exprimiert und für antimikrobielle Aktivitätsassays verwendet. Es sollte überprüft werden, ob sich die Aktivität des aus der Colonmukosa extrahierten Proteins, die gegen *E. coli* K12 mit dem RDA ermittelt werden konnte (Küchler, 2009), bestätigen lässt. Die ersten Messungen mit dem rekombinant exprimierten Protein wurden daher auch mit dem RDA und *E. coli* K12 durchgeführt. Das rekombinante HMGB2 zeigte, wie das aus dem Gewebe extrahierte Protein antimikrobielle Aktivität gegen dieses Bakterium und verifizierte damit die Daten der Diplomarbeit (Küchler, 2009). Ein wesentliches Ziel war zudem die Charakterisierung des Aktivitätsspektrums von HMGB2. Dazu wurden verschiedene kommensale Bakterien der humanen Darmflora mit dem rekombinanten Protein behandelt und auf wachstumshemmende Effekte untersucht. Neben der inhibitorischen Wirkung auf *E. coli* K12 konnte Aktivität gegen *Str. salivarius* und *Bif. adolescentis* detektiert werden. Darüber hinaus wurde gegen *Lac. acidophilus* eine schwache und gegen *Lac. fermentum* eine minimale antibakterielle Wirkung gemessen. Das Wachstum der Bakterien *Bif. breve*, *Bif. longum* und *Bac. vulgatus* konnte durch HMGB2 nicht beeinträchtigt werden. Es ist interessant, dass das Protein schwache Aktivität gegen *Lac. acidophilus* zeigte, gegen einen anderen Vertreter der Laktobazillen, *Lac. fermentum*, jedoch fast keine Hemmung festgestellt werden konnte. Noch extremer waren die Unterschiede bei den untersuchten Bifidobakterien. So konnte gegen *Bif. adolescentis* bereits bei 0,5 µg HMGB2 Aktivität festgestellt werden, gegen die beiden anderen untersuchten Bifidobakterien *Bif. breve* und *Bif. longum* hingegen wurden noch nicht einmal bei 2 µg Protein wachstumshemmende Effekte festgestellt. Das Ergebnis war nicht unerwartet, da in einer Publikation zur antimikrobiellen Aktivität des HMGB1 ebenfalls variable inhibitorische Wirkungen, gegen verschiedene Bakterien der Gattung *Escherichia*, festgestellt werden konnten (Gong et al., 2009). Bakterien können sich innerhalb einer

Gattung stark unterscheiden. Besonders deutlich lässt sich das an multiresistenten Krankenhauskeimen, wie zum Beispiel Methicillin-resistenten *S. aureus*, erkennen. Durch Mutationen können Bakterien Resistenzen gegen Antibiotika entwickeln und sich dadurch von anderen *S. aureus*-Bakterien abheben. Ein Ziel war es durch das Screening gegen die Bakterien ein Aktivitätsmuster festzustellen und zu überprüfen ob HMGB2 stärkere Aktivität gegen grampositive oder gramnegative Bakterien besitzt. HMGB2 zeigte sowohl gegen grampositive (*Bif. adolescentis*, *Lac. acidophilus*, *Lac. fermentum*) als auch gramnegative (*E. coli*) Bakterien Aktivität, jedoch gab es mit *Bif. breve*, *Bif. longum* und *Bac. vulgatus* auch Vertreter beider Gruppen die nicht sensitiv auf das Protein reagierten. Um eine definitive Aussage über die Wirkung des HMGB2 gegen weitere Keime der Darmflora treffen zu können müssen zusätzliche Bakterien getestet werden. Bei allen Bakterien, die im RDA sensitiv auf HMGB2 reagiert haben, konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung festgestellt werden. Je mehr rekombinantes Protein eingesetzt wurde, desto größer war der detektierte Hemmhof und damit die antimikrobielle Aktivität. Dies Ergebnis war zu erwarten, da sich mit steigender HMGB2-Menge immer mehr Proteine an die Bakterienzellen anlagern und daraufhin ihre Wirkung effektiver entfalten können. Die Aktivität, die mit den RDAs ermittelt werden konnte, sollte durch einen zweiten Assay verifiziert werden. Dazu wurde ein Trübungsassay verwendet, bei dem Bakterien in einer Suspension mit der Probe inkubiert werden. Im Anschluss wird photometrisch überprüft ob die Trübung der Lösung zunimmt und damit Bakterienwachstum gemessen werden kann. Bleibt die Trübung aus oder nimmt im Vergleich zur Negativkontrolle nur langsam zu, so besitzt die Probe antimikrobiell wirkende Substanzen. Da gegen *E. coli* im RDA die größte Aktivität gemessen werden konnte, wurde dieses Bakterium für den Trübungsassays ausgewählt. Wie im RDA konnten auch bei diesem Assay inhibitorische Effekte des HMGB2 auf *E. coli* gemessen und eine konzentrationsabhängige Wirkung gezeigt werden. Ab einer Konzentration von 5 µg/ml stieg der wachstumshemmende Effekt stark an. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine bestimmte Menge von HMGB2-Molekülen pro Zelle benötigt wird, damit das Protein eine optimale Aktivität entfalten kann. Bei allen mit dem RDA und Trübungsassay getesteten Bakterien handelte es sich um kommensale Bakterien der humanen Darmflora, beziehungsweise bei *E. coli* K12 um einen Laborstamm. Um zu untersuchen, ob HMGB2 auch Aktivität gegen pathogene Bakterien besitzt wurde *S. aureus*, ein Keim der häufig Hautinfektionen verursacht, mit dem rekombinant exprimierten Protein inkubiert. Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung sollte außerdem klären, ob nach der

Behandlung mit dem Protein morphologische Veränderungen an den Bakterien festgestellt werden können. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Kontrollen sind vital aussehende Bakterien, die keine Anzeichen von Zellschäden zeigen, sichtbar. Ein großer Teil der mit HMGB2 behandelten *S. aureus*-Bakterien weist hingegen deutliche Veränderungen auf. Die Membran einiger Bakterien ist teilweise beschädigt oder bereits so weit zerstört, dass sie nicht mehr nachzuweisen ist. Ein Ausbleiben solcher Schäden an den Bakterienzellen wäre ein Hinweis auf bakteriostatische Effekte des HMGB2 gewesen. Da die Aufnahmen sichtbar zerstörte Bakterien zeigen, ist von einer bakteriziden Wirkung des HMGB2 auszugehen. Offenbar schädigt HMGB2 die Membran der *S. aureus*-Bakterien, was den Tod der Zellen zur Folge hat. Theoretisch ist auch eine Wirkung auf bestimmte Faktoren in der Zelle denkbar, die daraufhin zu dem Abbau der Bakterienmembran führen. Der genaue Wirkungsmechanismus sollte in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden.

Es ist davon auszugehen, dass die Umgebungsbedingungen die antimikrobielle Aktivität von AMPs beeinflussen können. Schröder *et al.* konnte 2011 zeigen, dass das Defensin hBD-1, von dem lange Zeit keine große Aktivität nachgewiesen wurde, unter reduzierenden Bedingungen starke Aktivität gegen Bifidobakterien, Laktobazillen und den opportunistischen Pilz *Candida albicans* entfaltet (Schroeder *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Disulfidbrücken für eine potente antimikrobielle Funktion notwendig ist. Dieses Ergebnis macht deutlich welchen enormen Einfluss die Umgebung auf die Funktion von Proteinen haben kann. Daher ist es umso wichtiger bei der Analyse von AMPs Umgebungsbedingungen zu schaffen, die den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe kommen. Dazu wurden mit HMGB2 modifizierte RDAs mit unterschiedlichen pH-Werten und der Generierung eines reduzierenden Milieus durchgeführt. Bei *E. coli* und *Bif. adolescentis* führten alle von der Standardbedingung (nicht-reduzierend, pH 7,4) abweichenden Modifizierungen zu einer verminderten Aktivität. Bei *Str. salivarius* zeigte HMGB2 hingegen bei pH 5,7 und einem reduzierenden Milieu, im Vergleich mit den anderen Bedingungen, eine leichte Aktivitätszunahme. *Lac. acidophilus* zeigte keine Unterschiede in der Sensitivität auf HMGB2 durch Änderungen der Umgebungsbedingungen. Die getesteten Bedingungen wirkten sich somit nur sehr gering auf die Aktivität des rek. HMGB2 gegen die untersuchten Bakterien aus. Dies deutet darauf hin, dass das Protein recht unempfindlich gegenüber äußeren Einflüssen ist oder dass zumindest die Aktivität nicht besonders schnell durch Veränderungen des Milieus beeinträchtigt wird.

Es ist festzuhalten, dass antimikrobielle Aktivität des HMGB2 gegen verschiedene Bakterien ermittelt werden konnte. Neben grampositiven und gramnegativen kommensalen Bakterien konnte auch Aktivität gegen einen pathogenen Mikroorganismus festgestellt werden. Sowohl im RDA als auch im Trübungsassay wurde eine konzentrationsabhängige Wirkung detektiert. Gegen *S. aureus* konnte bakterizide Aktivität nachgewiesen werden, die eventuell auf Membran-schädigende Wirkung zurückzuführen ist.

## **6.2 Expression von HMGB2 im Gastrointestinaltrakt**

Die Versuche, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, zeigten deutlich, dass HMGB2 antimikrobielle Aktivität besitzt. Falls diese Funktion auch *in vivo* relevant sein sollte, muss das Protein in ausreichender Menge vorliegen. Daher wurde die Expression des HMGB2 im Gastrointestinaltrakt untersucht. Bei den Messungen konnte in allen untersuchten Geweben mRNA von HMGB2 nachgewiesen werden. Es gab es jedoch größere Unterschiede in der Höhe der ermittelten Transkripte. So konnten im Corpus, Antrum und Duodenum im Mittel zwischen 24000 und 34000 Transkripten pro 10 ng Gesamt-RNA detektiert werden. Im Ileum und Colon war die Expression mit durchschnittlich 71000 bzw. 65000 Transkripten pro 10 ng Gesamt-RNA ungefähr doppelt so hoch wie in den anderen untersuchten Abschnitten. Diese Daten zeigen, dass im Magen und Duodenum, also in den Abschnitten, in denen eine geringe mikrobielle Besiedelung vorliegt, die HMGB2-Expression verhältnismäßig niedrig ist. Die normale Flora des Ileums und Colons hingegen beherbergt große Mengen an Mikroorganismen und weist eine deutlich höhere HMGB2-Expression auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass HMGB2 eine Rolle in der Homeostase zwischen Wirt und Bakterien spielt und damit einen Bestandteil der Darmbarriere darstellt. Aufgrund der zahlreichen Mechanismen, die die Translation regulieren, können zwischen der RNA- und Proteinebene durchaus große Abweichungen auftreten. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Expression auf Proteinebene in den Magen- und Darmabschnitten untersucht. Dazu wurden mit einem HMGB2-Antikörper Westernblots und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. In den Westernblots konnte das Protein und eine dimere Form des HMGB2 mit einem starken Signal in allen Proteinextrakten des Colons detektiert werden. Die immunhistochemischen Färbungen bestätigten die Präsenz des HMGB2 in Colongewebe. Darüber hinaus wurde das Protein in den Abschnitten Ösophagus, Corpus, Antrum, Duodenum und Ileum detektiert. Die Färbeintensität zwischen verschiedenen Schnitten eines

Abschnittes wiesen teilweise deutliche Unterschiede auf. Diese können natürlich auf unterschiedliche Expressionslevel der Patienten, aus denen das Gewebe entnommen wurde, zurückzuführen sein. Jedoch können auch minimalste Unterschiede in den Versuchsbedingungen einen Einfluss auf die Färbeintensität haben. Durch die Limitationen des Probenmaterials wurden außerdem pro Magen- und Darmabschnitt nur 3 Patienten untersucht. Aufgrund der beschriebenen Unterschiede in der Intensität der Färbung eignen sich die Schnitte nur bedingt für einen Expressionsvergleich zwischen den Geweben. Die Aufnahmen zeigen jedoch zweifelsfrei, dass HMGB2 in allen untersuchten Geweben detektiert werden konnte. Das Protein war sowohl in Epithel- als auch in Entzündungszellen nachweisbar und war in den Abschnitten Ösophagus, Corpus und Antrum fast ausschließlich im Nukleus lokalisiert. Aufgrund der zahlreichen Funktionen von HMGB2 im Zellkern war dieses Ergebnis nicht überraschend. Besonders interessant waren daher die Färbungen der Ileum-, Colon- und Duodenum-Schnitte, bei denen das Protein zusätzlich im Zytoplasma von Epithelzellen nachgewiesen werden konnte. Die intensivste Färbung des Zytoplasmas wurde im Duodenum festgestellt.

### **6.3 Expression von HMGB2 bei CED**

Im menschlichen Organismus wird kontinuierlich eine enorme Anzahl von unterschiedlichen Proteinen hergestellt. Da jedes Protein spezifische Funktionen besitzt, sind der Ort an dem es benötigt wird sowie die optimale Menge für die im Körper ablaufenden Prozesse entscheidend. Kommt es zu Veränderungen im Expressionsmuster kann dies schwerwiegende Folgen haben und zur Entstehung von Krankheiten wie zum Beispiel Krebs führen. Treten Störungen in der Produktion von AMPs auf, kann die Abwehr gegen Mikroorganismen beeinträchtigt und der Ausbruch von Infektionen begünstigt werden. Durch die Messung der mRNA- und Proteinmenge sollte untersucht werden, ob zwischen Morbus Crohn-, Colitis ulcerosa- und Kontrollpatienten Unterschiede in der HMGB2-Expression festzustellen sind. Auf mRNA-Ebene konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen den 3 Gruppen detektiert werden. Aufgrund der beschriebenen Unterschiede in der Färbeintensität ist die Immunhistochemie nur bedingt für einen Vergleich der Expression geeignet. Da jedoch Colon-Schnitte von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Kontrollen verfügbar waren, wurden diese einer Färbung unterzogen. Bei der semiquantitativen Auswertung der Schnitte konnten ebenfalls keine sichtbaren Unterschiede detektiert werden.

Die Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung und die vorläufigen Proteindaten lassen den Schluss zu, dass die Expression des HMGB2 bei CED wahrscheinlich nicht verändert ist. Dennoch könnte es eventuell Unterschiede in einer potentiellen Sekretion oder der Menge des durch Abschilferung freigesetzten HMGB2 geben.

#### **6.4 Nachweisbarkeit von HMGB2 im Stuhl von CED-Patienten**

Die Bestimmung der Aktivitätsindices, wie dem Crohns disease activity index, ist meist mit invasiven Untersuchungen verbunden, die zum Teil hohe Kosten verursachen und für die CED-Patienten oft nicht besonders angenehm sind. Untersuchungen des Stuhlgangs auf die Nachweisbarkeit von bestimmten Faktoren, die während der Entzündung detektiert werden können, stellen ein vielversprechendes Hilfsmittel und damit eine Erleichterung in der Bestimmung des Schweregrades der Entzündung dar. Das Protein Calprotectin wird bereits als Marker für die Entzündung bei CED-Patienten verwendet (Kostakis et al., 2012). Im Jahr 2011 wurde HMGB1 im Stuhl von Kindern, die an CED litten, nachgewiesen und als neuer Marker für intestinale Entzündungen vorgeschlagen (Vitali et al., 2011). Es war daher naheliegend zu überprüfen, ob HMGB2 auch im Stuhl von CED-Patienten nachweisbar ist und ebenfalls mit der Entzündung korreliert werden kann. Bei den Untersuchungen konnte das Protein in jeweils einer von drei MC- und CU-Stuhlproben in Dot blots mit starkem Signal detektiert werden. In den restlichen CED-Proben und Kontrollen war das Protein nicht nachweisbar. Vitali *et al.* konnte HMGB1 in allen Stuhlproben der CED-Patienten feststellen, jedoch nicht in den Kontrollen. Die vorläufigen Ergebnisse des Dot blots zeigen, dass HMGB2 wie HMGB1 in den Kontrollen nicht detektiert werden konnte. HMGB2 konnte jedoch im Gegensatz zu HMGB1 nicht in allen CED-Proben nachgewiesen werden. In weiteren Versuchen sollte die Detektierbarkeit von HMGB2 im Stuhl genauer untersucht werden. Da das Protein in einem Teil der CED-Proben detektiert wurde ist eine eventuelle Verwendung des Proteins als Marker zumindest nicht auszuschließen. Durch die Kombination von verschiedenen Markern für die intestinale Entzündung kann die Diagnose des Entzündungsgrades wahrscheinlich deutlich verbessert und der Einsatz von invasiven Untersuchungen reduziert werden.

## **6.5 Die Rolle der antimikrobiellen Aktivität des HMGB2 im Gastrointestinaltrakt**

HMGB2 besitzt antimikrobielle Aktivität gegen kommensale Bakterien der Darmflora und wird in allen untersuchten Abschnitten des Gastrointestinaltraktes exprimiert. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage, welche Rolle das Protein in der Verteidigung gegen Mikroorganismen im Darm spielt. Wie bereits erwähnt, könnte die relativ hohe mRNA-Expression im Ileum und Colon, also in den Abschnitten in denen die größten Bakterienmengen vorliegen, ein Hinweis darauf sein, dass HMGB2 ein Bestandteil der Darmbarriere ist. Es wäre möglich, dass die Bakterien die Expression des HMGB2 induzieren. Das daraufhin vermehrt gebildete Protein könnte eine weitere Zunahme der Bakterienmenge unterbinden, indem es das Wachstum der Mikroorganismen negativ beeinflusst. Eine durch Bakterien induzierte Induktion der Expression konnte zum Beispiel für hBD-2 in intestinalen Epithelien gezeigt werden. In Zellkulturversuchen mit humanen Colonzellen waren nur minimale hBD-2 mRNA-Mengen nachweisbar, durch Behandlung mit IL-1 $\alpha$  oder bakteriellen Stimulationen stieg die Expression jedoch stark an (O'Neil et al., 1999). Da in den Abschnitten, in denen die höchsten mRNA-Werte gemessen wurden, auch die meisten Bakterien vorliegen, ist eine durch Bakterien induzierte Expression zumindest nicht auszuschließen. Es ist möglich, dass die erhöhte mRNA-Expression in den Abschnitten mit großer bakterieller Last eine Anpassung an die hohe mikrobielle Besiedelung ist. Durch immunhistochemische Färbungen konnten jedoch keine großen Unterschiede auf Proteinebene festgestellt werden. Es sollten weitere Analysen zur Proteinexpression erfolgen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der HMGB2-Expression und der Bakterienmenge zu untersuchen.

Damit HMGB2 seine inhibitorische Wirkung entfalten kann, muss ein direkter Kontakt mit den Bakterien hergestellt werden. Es stellt sich daher die Frage, wie das Protein aus den Zellen des Epithels gelangt. Eine Möglichkeit wäre, dass HMGB2 von absterbenden Zellen freigesetzt wird. Wie in der Einleitung bereits beschrieben gibt es im Darm einen hohen Umsatz von Zellen, wobei kontinuierlich alte durch neue Zellen ersetzt werden. Beim Absterben gelangen diese ins Darmlumen und die Bestandteile des Nukleus und Zytoplasmas können freigesetzt werden. Rose *et al.* konnte im Jahr 1998 mittels Zellkulturversuchen zeigen, dass Histon H1 von Zellen die sich vom Verband ablösen, in das Kulturmedium abgegeben wird. Darüber hinaus wurde das Protein von der Gruppe aus einem Colonproteinextrakt isoliert und antimikrobielle Wirkung des Histon H1 nachgewiesen. Da

die Extrakte der Zellkulturüberstände Aktivität zeigten, hat Rose *et al.* die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivität unter anderem auf das Histon H1 zurückzuführen ist (Rose *et al.*, 1998). Zusätzlich zu Histon H1 werden natürlich zahlreiche andere Proteine des Zellapparats freigesetzt. Neben bereits identifizierten AMPs besitzen wahrscheinlich viele weitere Proteine antimikrobielle Aktivität, die bis heute noch nicht festgestellt wurde. Auch wenn nur ein Bruchteil der Proteine antibiotische Wirkung besitzt, können die absterbenden Epithelzellen durch die gleichzeitige Freisetzung verschiedener AMPs eine gewaltige antimikrobielle Wirkung entfalten. HMGB2 ist wahrscheinlich neben vielen anderen Proteinen ein Faktor, der von den absterbenden Zellen freigesetzt wird und das Bakterienwachstum negativ beeinflusst. Neben der passiven Freisetzung muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass HMGB2 aktiv von Zellen des Epithels freigesetzt wird. In einer von Pusterla *et al.* im Jahr 2009 erschienenen Publikation wurde beschrieben, dass HMGB2 wie HMGB1 von myeloiden Zellen sekretiert werden kann (Pusterla *et al.*, 2009). Da myeloide Zellen zur Sekretion des Proteins befähigt sind, kann man davon ausgehen, dass auch andere Zelltypen in der Lage sind, HMGB2 aktiv freizusetzen. Bis heute gibt es keine Daten darüber, wie HMGB2 genau sekretiert wird. Wie in der Einleitung beschrieben, konnte der exakte Mechanismus der Sekretion des HMGB1 auch noch nicht vollständig geklärt werden. Eine Voraussetzung dafür scheint jedoch der Übergang des HMGB1 vom Nukleus ins Zytoplasma und die dortige Akkumulation des Proteins zu sein. Erst dann wird es von sekretorischen Endolysosomen aufgenommen und kann durch eine Fusion mit der Zellmembran freigesetzt werden (Gardella *et al.*, 2002; Bonaldi *et al.*, 2003). Vitali *et al.* konnte außerdem zeigen, dass HMGB1 bei CED-Patienten während der Entzündung im Zytoplasma von Epithelzellen nachweisbar ist und von diesen abgegeben werden kann (Vitali *et al.*, 2011). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen konnte HMGB2 zusätzlich zu der Lokalisation im Zellkern bei Duodenum-, Ileum- und Colon-Schnitten im Zytoplasma detektiert werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der zitierten Publikationen legt dies den Schluss nahe, dass HMGB2 eventuell wie HMGB1 aktiv sekretiert werden kann. Neben dem von absterbenden Zellen passiv freigesetzten HMGB2 könnte so durch aktive Sekretion von Epithelzellen die Konzentrationen des Proteins im Darmlumen erhöht und das Wachstum von diversen Mikroorganismen durch die antimikrobielle Aktivität des HMGB2 eingeschränkt werden. Die Aktivitätsdaten, die mit dem rekombinant exprimierten HMGB2 erhoben werden konnten, machen deutlich, dass das Protein tatsächlich inhibitorische Effekte auf verschiedene

kommensale Bakterien der humanen Darmflora besitzt und damit durchaus eine Rolle in der intestinalen Barriere spielen kann.

Bei der Analyse der HMGB2-Expression auf mRNA-Ebene sowie der Proteinexpression in Colongewebe von CED-Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollpatienten festgestellt werden. In der Publikation von Vitali *et al.*, bei der die Präsenz des HMGB1 im Stuhl von CED-Patienten nachgewiesen wurde, konnten auf mRNA- und Proteinebene ebenfalls keine quantitativen Unterschiede zwischen MC- und CU-Patienten und Kontrollen festgestellt werden (Vitali *et al.*, 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen des Stuhls von CED-Patienten zeigten, dass HMGB2 auch in einem Teil der Proben detektierbar war. Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese, dass das Protein aus Zellen des Darmepithels ins Darmlumen gelangt. Da wie bei der Publikation von Vitali *et al.* keine Unterschiede in der mRNA- und Proteinmenge nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Detektierbarkeit des HMGB2 im Stuhl nicht auf eine gesteigerte Expression zurückzuführen ist. Eventuell kommt es während der Entzündung zu einer verstärkten Sekretion von HMGB2 aus dem Pool des nuklearen Proteins. Außerdem sterben während der Entzündung wahrscheinlich deutlich mehr Epithelzellen ab, welche dann möglicherweise passiv HMGB2 freisetzen können. Diese Hypothesen sollten durch weitere Versuche überprüft werden. HMGB2 konnte im Stuhl von gesunden Probanden nicht detektiert werden. Dies muss jedoch nicht bedeuten, dass das HMGB2-Protein bei Gesunden nicht ins Darmlumen abgegeben wird. Wahrscheinlich kommt es während der Passage im Stuhl zu Degradationen der mitgeführten Proteine. Eventuell kann das HMGB2 aufgrund der geringeren Menge und dem Abbau im Stuhl in den gesunden Probanden nicht mehr nachgewiesen werden.

## **6.6 Identifizierung der für die antimikrobielle Aktivität essentiellen Bereiche von HMGB2**

Neben der Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität und Expression des HMGB2 sollte die Frage beantwortet werden, ob bestimmte Bereiche der Aktivität des Proteins zugeordnet werden können. Die Struktur von AMPs spielt eine entscheidende Rolle in der antimikrobiellen Aktivität. Im Jahr 2011 konnte Schröder *et al.* zeigen, dass die antimikrobielle Aktivität des reduzierten hBD-1 deutlich größer ist als die der oxidierten Form (Schroeder *et al.*, 2011). Neben den strukturellen Veränderungen wurde nachgewiesen,

dass die letzten sieben AS des C-Terminus für die Aktivität gegen *Bif. adolescentis* vorhanden sein müssen. Eine verkürzte Variante des hBD-1, bei der diese AS fehlten, war nicht mehr in der Lage, das Wachstum der Bakterien zu beeinträchtigen. Ein kurzes Peptid das die sieben AS enthielt, zeigte hingegen Aktivität gegen *Bif. adolescentis*. Durch die Versuche wurde nachgewiesen, dass dieser kurze Bereich essentiell für die antimikrobielle Aktivität des hBD-1 ist. In einer Veröffentlichung von Gong *et al.* konnte 2009 der für die antimikrobielle Aktivität des HMGB1 entscheidende Bereich identifiziert werden (Gong et al., 2009). Die rekombinante Expression der A-Box, B-Box und des C-Terminus und die anschließende Analyse der Peptide auf antimikrobielle Aktivität zeigten, dass der C-Terminus für diese Funktion essentiell ist. Durch die Generierung von HMGB1-Mutanten mit kurzen AS-Deletionen konnte der für die Aktivität entscheidende Bereich weiter spezifiziert und auf die fünf AS 201-205 (EDEED) eingegrenzt werden. Um die Aktivität des HMGB2 auf einen Bereich einzugrenzen wurden ebenfalls die zwei HMG-Boxen und der saure C-Terminus des Proteins mit dem pET-SUMO-Expressionssystem rekombinant exprimiert und die Peptide auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Sowohl das A-Box- als auch B-Box-Peptid zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt auf das Wachstum von *E. coli*. Die Peptide verursachten bei pH 5,7 und 7,4 bereits bei einer Menge von 0,5 µg einen Hemmhofdurchmesser von 5 – 6 mm. Das C-Terminus-Peptid zeigte hingegen nur bei der höchsten Konzentration (10 µg) und dem pH von 5,7 antimikrobielle Aktivität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der C-Terminus für die Aktivität des HMGB2 nicht entscheidend ist. Um diese Daten zu verifizieren wurde die Synthese der letzten 22 AS des C-Terminus in Auftrag gegeben und das Peptid mit Hilfe des RDA auf antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* untersucht. Bei diesen Messungen konnten weder bei 2 µg noch bei 10 µg inhibitorische Effekte gemessen werden. Die Daten, die mit den rekombinant exprimierten Peptiden und dem synthetisch hergestellten C-Terminus-Peptid erhoben wurden machen deutlich, dass bei HMGB2 die beiden DNA-Bindedomänen, HMG-Box A und HMG-Box B, die antimikrobielle Aktivität des Proteins vermitteln. Sowohl die A-Box als auch die B-Box besitzen eine positive Ladung und erfüllen damit ein wesentliches Charakteristikum, das auch in vielen anderen AMPs zu finden ist. Aufgrund der großen Ähnlichkeit in der AS-Zusammensetzung des HMGB1 und HMGB2 war dieses Ergebnis überraschend. Da besonders die AS-Abfolge im C-Terminus beider Proteine sehr ähnlich ist, wurde im Vorfeld angenommen, dass dieser Bereich des Proteins auch im HMGB2 die Aktivität vermittelt. Es ist wahrscheinlich, dass die HMGB-Proteine auf ein gemeinsames Ursprungsgen zurückzuführen sind. Die geringen Unterschiede

im C-Terminus des HMGB2 zum HMGB1 könnten natürlich erklären warum der Teil des Proteins keine Aktivität besitzt. Im Laufe der Evolution hätte HMGB2 durch Mutationen im C-Terminus die antimikrobielle Aktivität verlieren, bzw. HMGB1 durch Mutationen hinzugewinnen können. Es wäre jedoch ungewöhnlich, dass HMGB2 parallel zum HMGB1 antimikrobielle Aktivität erlangt hat, die auf andere Abschnitte des Proteins (HMG-Boxen), zurückzuführen ist. Eventuell lassen sich die Unterschiede in der Lokalisation der für die Aktivität der Proteine essentiellen Bereiche auf technische Probleme zurückführen. Die im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimierten Proteine und das von Gong *et al.* rekombinant exprimierte HMGB1 wurden mit unterschiedlichen Systemen hergestellt. HMGB2 enthielt aufgrund der Eigenschaften des Vektors und der SUMO-Protease-Schnittstelle im Fusionsprotein keine zusätzlichen AS. Bei der HMGB1-Publikation hingegen enthielten alle exprimierten Proteine nach der Aufreinigung immer noch einen His-Tag, der eventuell die Aktivität der Proteine beeinträchtigte. Die rekombinant exprimierten HMG-Box A und B Fusionsproteine enthielten darüber hinaus noch ein weiteres Protein, die Dihydrofolatreduktase (DHFR). Das für eine verbesserte Expression angefügte DHFR besitzt mit 187 AS (Uniprot, DHFR (P00374)) eine beachtliche Länge und kann die Faltung der HMG-Box-Peptide wahrscheinlich beeinträchtigen. Außerdem wurde in der Publikation nicht angegeben in welchen Puffern die rekombinant exprimierten Proteine für die Aktivitätsassays gelöst waren. Um abschließend zu klären ob im HMGB1 und HMGB2 wirklich verschiedene Abschnitte für die antimikrobielle Aktivität verantwortlich sind, sollten beide Proteine mit dem selben System exprimiert und auf antimikrobielle Aktivität untersucht werden.

## **6.7 Technische Aspekte der rekombinanten Expression**

Um die Funktion von Proteinen untersuchen zu können werden diese in großen Mengen benötigt. Da die Extraktion aus natürlichen Quellen oft nicht ausreichende Proteinmengen liefert und die chemische Synthese von großen Proteinen noch nicht möglich ist, beschäftigen sich immer mehr Arbeitsgruppen mit der rekombinanten Expression. Leider treten bei der rekombinanten Expression von bestimmten Proteinen, wie zum Beispiel Membranproteinen oder AMPs, häufig größere Probleme auf (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004; Francis and Page, 2010; Li, 2011). In der Versuchsplanung sollten daher einige Punkte beachtet werden um potentielle Schwachstellen im Vorfeld zu erkennen beziehungsweise während dem Versuch auftretende Probleme frühzeitig beheben zu können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden

mehrere Proteine rekombinant exprimiert. Dabei traten einige Schwierigkeiten auf, die im Folgenden kurz erörtert werden.

Für die rekombinante Expression von Proteinen stehen zahlreiche kommerzielle Zellen und Expressionssysteme zur Verfügung. Aufgrund der einfachen Handhabung, den geringen Kosten und den Erfahrungen der Arbeitsgruppe wurde ein Expressionssystem mit *E. coli*-Zellen ausgewählt. Ein wesentlicher Vorteil des verwendeten pET-SUMO-Expressionssystems ist, dass die Transkription des Zielgens stark reguliert wird. Es können daher auch für die Bakterien toxische Proteine exprimiert werden, da diese erst durch Zugabe des IPTG synthetisiert werden und so nicht schon in frühen Wachstumsphasen die Bakterien beeinträchtigen. Wie im Kapitel 5.1 beschrieben war es nicht möglich, das rekombinante HMGB2 im Zell-Lysat nachzuweisen. Durch Modifikationen der Wachstumsbedingungen konnte dieses Problem nicht behoben werden. Die Suche nach potentiellen Ursachen ergab, dass 7 Codons des humanen *HMGB2* nur selten in *E. coli* verwendet werden. Nach der Optimierung der Sequenz auf die *E. coli* Codon-Usage, der Klonierung und Transformation war das Protein im Bakterienlysat zu detektieren. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass bei der rekombinanten Expression eines Proteins in einem fremden Organismus die Unterschiede im Codon-Usage des kodierenden Gens im Vorfeld gut analysiert und seltene Codons ausgetauscht werden sollten.

Darüber hinaus haben die Vorversuche gezeigt, dass bei der Austestung der optimalen Bedingungen nicht zu kleine Volumina der Expressionskulturen verwendet werden sollten. Denn wie bereits beschrieben, treten häufig Probleme bei der rekombinanten Expression von AMPs auf und die Ausbeute der Proteine ist meist trotz Optimierung sehr niedrig. Werden bei Vorversuchen zu kleine Kulturen verwendet, lassen sich geringe Proteinmengen eventuell nicht detektieren und vielversprechende Expressionen werden frühzeitig eingestellt. Besonders bei Versuchen mit *E. coli*, bei denen die Nährmedien oft nur geringe Kosten aufweisen, sollten daher größere Volumina getestet werden. Laut des Herstellerprotokolls des verwendeten pET-SUMO-Expressionssystems sollen bei Vorversuchen 5 ml Kulturen verwendet werden. Wahrscheinlich lassen sich jedoch schwach exprimierte Proteine mit Coomassie-gefärbten SDS-Gelen in solchen Kulturen nicht nachweisen. Die Verwendung von 5- bis 10-fach größeren Volumina sollte bei Vorversuchen daher in Betracht gezogen werden. Wenn die rekombinant exprimierten Proteine auf antimikrobielle Aktivität getestet werden sollen, muss außerdem darauf geachtet werden, dass durch die Aufreinigung ein hoher Reinheitsgrad erzielt wird. Darüber hinaus sollten während der Aufreinigung keine

antimikrobiell aktiven Puffer verwendet oder diese abschließend restlos entfernt werden. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Puffer und Lösungsmittel, besonders die der letzten Aufarbeitungsschritte auf antimikrobielle Aktivität überprüft. Durch die abschließende Verwendung der RP-C18-Säule konnten alle Substanzen der Aufreinigung von dem Protein getrennt werden. Da das Laufmittel mit AcN, TFA und Wasser ausschließlich leicht flüchtige Bestandteile enthielt, war es möglich, diese durch Eintrocknen mit der Vakuumzentrifuge zu entfernen. Die Analyse des rekombinant exprimierten HMGB2 mit SDS-PAGE und HPLC zeigte, dass das rekombinant exprimierte Protein eine hohe Reinheit besaß.

Durch die Expertise, die während der Herstellung des kompletten HMGB2-Proteins erworben werden konnte, gelang die Expression des A-Box- und B-Box-Peptids ohne größere Schwierigkeiten. Die Analyse der beiden Peptide mittels HPLC und SDS-Gelen zeigte, dass ebenfalls eine hohe Reinheit erzielt wurde. Sowohl das A-Box- als auch B-Box-Peptid waren in den mit Silbernitrat gefärbten Gelen etwas über der mit dem ProtParam-Tool (ExPASy) berechneten Größe zu detektieren. Eventuell lag dies an Modifikationen der Peptide, die in den Bakterienzellen stattgefunden haben oder während der Aufarbeitung entstanden sind. Wie im Kapitel 5.6 bereits erwähnt, trat gegen Ende der Aufreinigung des C-Terminus-Peptids jedoch ein Problem auf. Direkt nach der Expression konnte das C-Terminus-Fusionsprotein mit Coomassie-gefärbten SDS-Gelen noch in Form einer Doppelbande detektiert werden. Nach dem Verdau des Fusionsproteins mit der SUMO-Protease war das C-Terminus-Peptid jedoch in den SDS-Gelen nicht mehr nachweisbar. Mögliche Ursachen für dieses Problem können die AS-Zusammensetzung und die geringe Größe des Peptids sein. Um eine gute Auftrennung des Proteins mit der Größe von 4,6 kDa (ProtParam, ExPASy) im Gel zu gewährleisten wurden hohe Acrylamidkonzentrationen (15 % und 18 %) verwendet. Außerdem wurden in Vorversuchen Tricin-SDS-Gele nach Schägger (Schägger and Von Jagow, 1987) mit leichten Modifikationen (siehe (Küchler, 2009)) getestet. Die Gele wurden mit Coomassie oder Silbernitrat gefärbt, es konnte jedoch kein C-Terminus-Peptid festgestellt werden. Da bei der Konzentrationsbestimmung nach Smith jedoch Peptidmengen nachgewiesen wurden ist davon auszugehen, dass sich das Peptid durch diese Färbemethoden nicht detektieren lässt. Der Coomassie-Farbstoff und die Silberionen der Silberfärbung reagieren besonders stark mit basischen AS wie Histidin, Lysin und Arginin bzw. polaren AS wie Glutamin und Asparagin. Die Intensität der Färbung ist daher von dem Anteil dieser AS im nachzuweisenden Protein abhängig. Das exprimierte C-Terminus-Peptid besaß jedoch 23 saure und nur weniger der für die Färbemethoden wichtigen AS. Dies könnte eine mögliche

Ursache für die schlechte Detektierbarkeit in den Gelen darstellen. Darüber hinaus sind kleine Peptide meist schwer mit Coomassie- und Silberfärbungen in Acrylamidgelen nachweisbar.

## **6.8 HMGB2 als antimikrobieller Wirkstoff in der Therapie von Infektionen**

Da immer mehr Mikroorganismen Resistenzen gegen Antibiotika entwickeln wird die Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen mit hohem finanziellen Einsatz und Aufwand vorangetrieben. Die Verwendung von körpereigenen Proteinen, wie den AMPs, gegen die es bis jetzt noch keine Resistenzen gibt, stellt eine mögliche Alternative in der Behandlung von Infektionen dar. Eine der Fragen, die sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit ergibt, ist ob HMGB2 in der Behandlung von Infektionen eingesetzt werden kann. Aufgrund der festgestellten antimikrobiellen Aktivität gegen diverse Bakterien ist eine Verwendung prinzipiell möglich, muss jedoch im Vorfeld ausgiebig untersucht werden.

Ein Aspekt der geklärt werden sollte, ist in welcher Form das Protein verabreicht werden kann. Eignet sich das HMGB2-Protein für eine systemische Verabreichung? Wie im Kapitel 3.6.3.1 der Einleitung bereits beschrieben, kann HMGB1 von diversen Immunzellen sekretiert werden und daraufhin wahrscheinlich Aktivität gegen Mikroorganismen entfalten. Darüber hinaus konnte HMGB1 jedoch auch mit Entzündungen assoziiert werden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von HMGB1 und HMGB2 sowie den teilweise überlappenden Funktionen muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass HMGB2 bei einer systemischen Verabreichung ebenfalls Entzündungen auszulösen kann. Da einige Rezeptoren, wie zum Beispiel RAGE, sowohl HMGB1 als auch HMGB2 detektieren können (Pusterla et al., 2009), ist davon auszugehen, dass beide Proteine ähnliche Effekte auslösen. Im Jahr 2009 wurde in einer Publikation von Sloots *et al.* beschrieben, dass ein rekombinant hergestelltes HMGB2-Derivat (AS 1-186) die Fähigkeit besitzt, DNA zu binden und diese bei *in vitro*-Versuchen in Tumorzellen transportieren kann. Die Gruppe hat das verkürzte HMGB2 aufgrund dessen als möglichen nicht-viralen Gen-Transporter vorgeschlagen. Es ist daher durchaus möglich, dass das komplette HMGB2 ebenfalls in Zellen aufgenommen werden kann. Wie in Kapitel 3.6.3.1 beschrieben, kann sich das HMGB1-Protein zwischen Zellkern und Zytoplasma bewegen. Möglicherweise ist auch HMGB2 zu diesem Übergang befähigt. Falls das komplette HMGB2-Protein tatsächlich von diversen Zellen aufgenommen werden kann und vom Zytoplasma in den Nukleus gelangt, kann es dort aufgrund der regulatorischen Eigenschaften

eventuell die Transkription von verschiedenen Genen verändern. Auf diesem Wege könnte durch die systemische Verabreichung des Proteins die Expression von verschiedenen Genen beeinflusst werden. Die möglichen Folgen für den Organismus sind nicht abzusehen. Außerdem muss bedacht werden, dass das HMGB2-Protein neben den bereits bekannten Funktionen wahrscheinlich noch weitere Funktionen besitzt, die bis heute noch nicht identifiziert wurden. So ist zum Beispiel die Wirkung des Proteins als Signalmolekül innerhalb oder außerhalb der Zelle möglich. Die systemische Verabreichung des HMGB2 könnte in diesem Fall zu einer Desensibilisierung von Rezeptoren führen und dadurch bleibende Schäden und Nebenwirkungen verursachen. Um genauere Aussagen über eine Behandlung mit dem Protein treffen zu können, muss unter anderem geklärt werden ob HMGB2 tatsächlich von Zellen aufgenommen werden kann und ob ein Übergang in den Zellkern möglich ist. Es ist auch nicht auszuschließen, dass bei einer systemischen Verabreichung des HMGB2 und einer häufigen Verwendung des Proteins zur Behandlung von Infektionen, Bakterien auch Resistenzen gegen HMGB2 entwickeln. Aufgrund der zahlreichen Funktionen im Zellkern und den damit verbundenen weitreichenden und unvorhersehbaren Nebenwirkungen ist eine systemische Verabreichung bei heutigem Kenntnisstand utopisch.

Ist eine topische Applikation des HMGB2-Proteins möglich? Die lokale Verabreichung des Proteins, zum Beispiel in Form einer Salbe, wäre mit deutlich weniger Risiken verbunden. Natürlich müssen auch hier im Vorfeld einige Fragen geklärt werden. Unter anderem sollte untersucht werden ob bei einer topischen Applikation das HMGB2-Protein nur lokal wirkt oder ob dieses in die Blutbahn eindringen kann. Es muss natürlich überprüft werden, ob HMGB2 eventuell chemotaktische Effekte auf Immunzellen besitzt und damit entzündungsfördernd wirken kann.

Neben der Anwendung des kompletten Proteins ist auch der Einsatz des A-Box- und B-Box-Peptids als antimikrobieller Wirkstoff möglich, da diese offenbar die antimikrobiellen Effekte vermitteln. Für die Produktion von antibiotischen Wirkstoffen spielen, wie bei allen medizinischen Produkten, die Herstellungskosten eine entscheidende Rolle. Da die beiden DNA-Bindedomänen deutlich kürzer sind als das komplette Protein ist die Synthese des HMG-Box A oder B Peptids deutlich preiswerter. Sollte es gelingen die antimikrobielle Aktivität weiter zu spezifizieren und auf wenige AS einzugrenzen, könnte ein kurzes Peptid synthetisiert werden, das diese Sequenz enthält. Die Produktionskosten des Peptids würden

dadurch weiter reduziert werden und eine mögliche Verwendung des Peptides in einem Medikament attraktiver machen.

## 6.9 Weiterführende Arbeiten

Eine besonders ergiebige Quelle für die Identifizierung von neuen antimikrobiellen Wirkstoffen stellen die von körpereigenen Zellen in großer Vielzahl produzierten AMPs dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige neue Daten zu einem dieser AMPs, dem HMGB2-Protein, generiert werden. Um ein noch besseres Verständnis über die antimikrobielle Aktivität des Proteins und die Rolle des HMGB2 im Gastrointestinaltrakt zu erlangen sollten weitere Versuche durchgeführt werden.

Ein wesentlicher Bestandteil sollte bei den Arbeiten die Berücksichtigung der im Gastrointestinaltrakt herrschenden Umgebungsbedingungen darstellen. Die getesteten pH-Werte und das reduzierende Milieu besaßen keinen großen Effekt auf die antimikrobielle Aktivität des HMGB2. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Umgebung keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins besitzt. Es müssen weitere Faktoren bei dem Screening gegen verschiedene kommensale und pathogene Mikroorganismen mit einbezogen werden, damit durch die *in vitro*-Assays bessere Rückschlüsse auf die tatsächliche Aktivität des HMGB2 in den Abschnitten des Gastrointestinaltraktes gezogen werden können.

Um ein besseres Verständnis darüber zu erlangen weshalb manche Bakterien sensitiv auf HMGB2 reagieren und andere nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigt werden, sollte der Wirkungsmechanismus der Aktivität weiter untersucht werden. Es bleibt zu klären, wie sich das Protein an die Membran der Mikroorganismen anlagert und wodurch die antimikrobiellen Effekte verursacht werden. Es sollte in weiteren Studien untersucht werden, ob die durch HMGB2 verursachten Schäden an *S. aureus* auf direkte Interaktionen mit der Membran oder auf Folgen von intrazellulären Veränderungen des Bakterienstoffwechsels zurückzuführen sind. Durch die Identifizierung der genauen Mechanismen der Aktivität des HMGB2 lassen sich eventuell auch die Unterschiede der Sensitivität von Bakterien innerhalb einer Gattung erklären.

Durch die Etablierung und Untersuchung von HMGB2 Knock-out Mäusen lassen sich wahrscheinlich weitere Informationen über die Rolle des Proteins im Gastrointestinaltrakt sammeln. Veränderungen in der Darmflora und eine erhöhte Bakterienlast in den Knock-out Mäusen könnten die Hypothese bestätigen, dass HMGB2 ein Bestandteil der intestinalen

Barriere darstellt. Darüber hinaus könnte die Überexpression des HMGB2 in einem weiteren Mausmodell zusätzliche Daten liefern. Mit dem Modell könnte getestet werden ob die Mäuse resistenter gegen Infektionen sind und ob diese eventuell bei chemisch induzierten Entzündungsreaktionen verstärkte oder verminderte Reaktionen zeigen. Eine erhöhte Resistenz würde ebenfalls die antibiotische Wirkung des HMGB2 im Darm bekräftigen.

Es sollte außerdem geklärt werden, welchen Einfluss hohe HMGB2-Konzentrationen auf humane Zellen haben. Ein Aspekt, der unbedingt untersucht werden muss, ist ob HMGB2 wie HMGB1 die Fähigkeit besitzt, Entzündungen auszulösen und ob große Mengen des Proteins humane Zellen schädigen können. Außerdem sollte die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass die Epithelzellen des Duodenums, Ileums und Colons zur Sekretion von HMGB2 ins Darmlumen befähigt sind, überprüft werden.

In den mRNA- und Protein-Analysen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression des HMGB2 zwischen CED-Patienten und Kontrollpatienten festgestellt werden. Es ist aber durchaus möglich, dass bei akuten oder chronischen Entzündungen in anderen Organen, wie zum Beispiel der Blase oder Lunge, eine veränderte Expression des HMGB2 vorliegt. In zukünftigen Untersuchungen von entzündlichen Erkrankungen, bei denen eine reduzierte oder auch erhöhte Expression von AMPs vermutet wird, sollte HMGB2 berücksichtigt werden.

Die Frage, ob sich HMGB2 als Marker für intestinale Entzündungen eignet, konnte aufgrund der geringen Probenzahl nicht abschließend beantwortet werden. Für eine zukünftige Studie sollte ein größeres Kollektiv, mit 20-30 Stuhlproben pro Gruppe, erstellt werden. Damit eine mögliche Korrelation zwischen der HMGB2-Menge und der Entzündung ermittelt werden kann, ist es essentiell umfangreiche Daten zu dem Entzündungsgrad der Patienten zum Zeitpunkt der Stuhlentnahme zu sammeln.

## Literaturverzeichnis

- Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003). HMGB proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 170–178.
- Balani, P., Boulaire, J., Zhao, Y., Zeng, J., Lin, J., and Wang, S. (2009). High mobility group box2 promoter-controlled suicide gene expression enables targeted glioblastoma treatment. *Mol. Ther.* 17, 1003–1011.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1998). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.* 102, 874–880.
- Best, W.R., Bechtel, J.M., Singleton, J.W., and Kern, F., Jr (1976). Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70, 439–444.
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257–263.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–368.
- Bianchi, M.E., and Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 496–506.
- Bischoff, S.C. (2009). Probiotika, Präbiotika und Synbiotika (Thieme, Stuttgart).
- Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61–92.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22, 5551–5560.
- Bowie, A., and O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67, 508–514.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 152–153.
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtländer, T., Ferrier, P., Ferrari, S., and Bianchi, M.E. (1999). The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat. Genet.* 22, 276–280.

- Camp, J.G., Kanther, M., Semova, I., and Rawls, J.F. (2009). Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterology* 136, 1989–2002.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., and Markl, J. (2003). *Biologie* (Spektrum Akademischer Verlag).
- Canny, G.O., Trifonova, R.T., Kindelberger, D.W., Colgan, S.P., and Fichorova, R.N. (2006). Expression and function of bactericidal/permeability-increasing protein in human genital tract epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 194, 498–502.
- Catena, R., Escoffier, E., Caron, C., Khochbin, S., Martianov, I., and Davidson, I. (2009). HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids. *Biol. Reprod.* 80, 358–366.
- Cederlund, A., Gudmundsson, G.H., and Agerberth, B. (2011). Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* 278, 3942–3951.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., et al. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 4, 702–707.
- Chevalier, F. (2010). Standard Dyes for Total Protein Staining in Gel-Based Proteomic Analysis. *Materials* 3, 4784–4792.
- Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S.-P., Castillo, P.A., De Jong, M.F., Winter, M.G., Winter, S.E., Wehkamp, J., Shen, B., et al. (2012). Human  $\alpha$ -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* 337, 477–481.
- Corbin, B.D., Seeley, E.H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M.R., Torres, V.J., Anderson, K.L., Dattilo, B.M., Dunman, P.M., Gerads, R., et al. (2008). Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 319, 962–965.
- Das, D., and Scovell, W.M. (2001). The binding interaction of HMG-1 with the TATA-binding protein/TATA complex. *J. Biol. Chem.* 276, 32597–32605.
- Didierlaurent, A., Sirard, J.-C., Kraehenbuhl, J.-P., and Neutra, M.R. (2002). How the gut senses its content. *Cell. Microbiol.* 4, 61–72.
- Domachowske, J.B., Bonville, C.A., Dyer, K.D., and Rosenberg, H.F. (1998a). Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. *Nucleic Acids Res* 26, 5327–5332.
- Domachowske, J.B., Dyer, K.D., Adams, A.G., Leto, T.L., and Rosenberg, H.F. (1998b). Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res* 26, 3358–3363.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., and Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr. Purif.* 37, 203–206.

- Elphick, D., Liddell, S., and Mahida, Y.R. (2008). Impaired luminal processing of human defensin-5 in Crohn's disease: persistence in a complex with chymotrypsinogen and trypsin. *Am. J. Pathol.* *172*, 702–713.
- Elsbach, P. (1998). The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J. Leukoc. Biol.* *64*, 14–18.
- Ericksen, B., Wu, Z., Lu, W., and Lehrer, R.I. (2005). Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 269–275.
- Fahlgren, A., Hammarstrom, S., Danielsson, A., and Hammarstrom, M.-L. (2004). beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* *137*, 379–385.
- Feng, Y., Huang, N., Wu, Q., Bao, L., and Wang, B. (2005a). Alpha-helical domain is essential for antimicrobial activity of high mobility group nucleosomal binding domain 2 (HMGN2). *Acta Pharmacol. Sin.* *26*, 1087–1092.
- Feng, Y., Huang, N., Wu, Q., and Wang, B. (2005b). HMGN2: a novel antimicrobial effector molecule of human mononuclear leukocytes? *J. Leukoc. Biol.* *78*, 1136–1141.
- Forchielli, M.L., and Walker, W.A. (2005). The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br. J. Nutr.* *93 Suppl 1*, S41–48.
- Francis, D.M., and Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 5*, Unit 5.24.1–29.
- Gallo, R.L., and Nizet, V. (2003). Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr Allergy Asthma Rep* *3*, 402–409.
- Ganz, T. (2003). The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* *43*, 300–304.
- Ganz, T. (2004). Antimicrobial polypeptides. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 34–38.
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., and Lehrer, R.I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* *76*, 1427–1435.
- Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., Bianchi, M.E., and Rubartelli, A. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* *3*, 995–1001.
- Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S.K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S.P., Crabb, J.W., Ganz, T., and Bevins, C.L. (2002). Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat. Immunol.* *3*, 583–590.
- Golec, M. (2007). Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide. *Ann Agric Environ Med* *14*, 1–4.

- Gong, W., Li, Y., Chao, F., Huang, G., and He, F. (2009). Amino acid residues 201-205 in C-terminal acidic tail region plays a crucial role in antibacterial activity of HMGB1. *J. Biomed. Sci.* *16*, 83.
- Goodwin, G.H., Sanders, C., and Johns, E.W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* *38*, 14–19.
- Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., and Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur. J. Biochem.* *238*, 325–332.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.-M. (2001). Isolation and Characterization of Human  $\beta$ -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *J. Biol. Chem.* *276*, 5707–5713.
- Harder, J., Gläser, R., and Schröder, J.-M. (2007). Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J. Endotoxin Res.* *13*, 317–338.
- Harder, J., and Schroder, J.-M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* *277*, 46779–46784.
- Hill, D.A., and Artis, D. (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 623–667.
- Hock, R., Furusawa, T., Ueda, T., and Bustin, M. (2007). HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol.* *17*, 72–79.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* *284*, 1313–1318.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* *10*, 159–169.
- Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V., and Gordon, J.I. (2003). Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* *4*, 269–273.
- Howell, S.J., Wilk, D., Yadav, S.P., and Bevins, C.L. (2003). Antimicrobial polypeptides of the human colonic epithelium. *Peptides* *24*, 1763–1770.
- I. B, Autenrieth (2003). Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *Journal Für Gastroenterologische Und Hepatologische Erkrankungen*.
- Jäger, S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2010). Antimicrobial Peptides in Gastrointestinal Inflammation. *International Journal of Inflammation* *2010*, 1–11.
- Janeway, C.A., Jr (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54 Pt 1*, 1–13.
- Kawasaki, H., and Iwamuro, S. (2008). Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect Disord Drug Targets* *8*, 195–205.

Kehl-Fie, T.E., Chitayat, S., Hood, M.I., Damo, S., Restrepo, N., Garcia, C., Munro, K.A., Chazin, W.J., and Skaar, E.P. (2011). Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 10, 158–164.

Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R.J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317.

Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12, 319–330.

Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., and Flavell, R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731–734.

Kocsis, A.K., Szabolcs, A., Hofner, P., Takács, T., Farkas, G., Boda, K., and Mándi, Y. (2009). Plasma concentrations of high-mobility group box protein 1, soluble receptor for advanced glycation end-products and circulating DNA in patients with acute pancreatitis. *Pancreatology* 9, 383–391.

Kostakis, I.D., Cholidou, K.G., Vaiopoulos, A.G., Vlachos, I.S., Perrea, D., and Vaos, G. (2012). Fecal Calprotectin in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Dig. Dis. Sci.*

Küchler, R. (2009). Charakterisierung antimikrobieller Stoffe des Gastrointestinaltraktes. Diplomarbeit. Universität Hohenheim.

Kwon, J.-H., Kim, J., Park, J.Y., Hong, S.M., Park, C.W., Hong, S.J., Park, S.Y., Choi, Y.J., Do, I.-G., Joh, J.-W., et al. (2010). Overexpression of high-mobility group box 2 is associated with tumor aggressiveness and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 16, 5511–5521.

Laurent, B., Randrianarison-Huetz, V., Maréchal, V., Marchal, V., Mayeux, P., Dusanter-Fourt, I., and Duménil, D. (2010). High-mobility group protein HMGB2 regulates human erythroid differentiation through trans-activation of GFI1B transcription. *Blood* 115, 687–695.

Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S., Jackson, R., and Eisenhauer, P. (1991). Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* 137, 167–173.

Li, Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expr. Purif.* 80, 260–267.

Lippert, H. (2000). *Lehrbuch Anatomie* (Urban & Fischer Verlag).

Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Histologie* (Thieme, Stuttgart).

Maeda, S., Hikiba, Y., Shibata, W., Ohmae, T., Yanai, A., Ogura, K., Yamada, S., and Omata, M. (2007). Essential roles of high-mobility group box 1 in the development of murine colitis and colitis-associated cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 394–400.

- Magalhaes, J.G., Tattoli, I., and Girardin, S.E. (2007). The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin. Immunol.* *19*, 106–115.
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* *1462*, 1–10.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 4–9.
- Ming, L., Xiaoling, P., Yan, L., Lili, W., Qi, W., Xiyong, Y., Boyao, W., and Ning, H. (2007). Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus. *Hum. Reprod.* *22*, 1810–1815.
- Mukherjee, S., Vaishnava, S., and Hooper, L.V. (2008). Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 3019–3027.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K., and Gallo, R.L. (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* *414*, 454–457.
- Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., Mueller, H.A.G., and Stange, E.F. (2006). A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts. *Journal of Microbiological Methods* *65*, 335–345.
- O’Neil, D.A., Porter, E.M., Elewaut, D., Anderson, G.M., Eckmann, L., Ganz, T., and Kagnoff, M.F. (1999). Expression and Regulation of the Human  $\beta$ -Defensins hBD-1 and hBD-2 in Intestinal Epithelium. *J Immunol* *163*, 6718–6724.
- Odze, R. (2003). Diagnostic problems and advances in inflammatory bowel disease. *Mod. Pathol.* *16*, 347–358.
- Oh, J.E., and Lee, H.K. (2012). Autophagy in Innate Recognition of Pathogens and Adaptive Immunity. *Yonsei Medical Journal* *53*, 241.
- Parseghian, M.H., and Luhrs, K.A. (2006). Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem. Cell Biol.* *84*, 589–604.
- Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2004). The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol.* *41*, 1099–1108.
- Pusterla, T., De Marchis, F., Palumbo, R., and Bianchi, M.E. (2009). High mobility group B2 is secreted by myeloid cells and has mitogenic and chemoattractant activities similar to high mobility group B1. *Autoimmunity* *42*, 308–310.
- Read, S., Malmström, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* *192*, 295–302.
- Rehm, H. (2006). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* (Spektrum Akademischer Verlag).

- Ronfani, L., Ferraguti, M., Croci, L., Ovitt, C.E., Schöler, H.R., Consalez, G.G., and Bianchi, M.E. (2001). Reduced fertility and spermatogenesis defects in mice lacking chromosomal protein Hmgb2. *Development* *128*, 1265–1273.
- Rose, F.R., Bailey, K., Keyte, J.W., Chan, W.C., Greenwood, D., and Mahida, Y.R. (1998). Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* *66*, 3255–3263.
- Rosenberg, H.F. (1995). Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* *270*, 7876–7881.
- Rosenberg, H.F. (1998). The eosinophil ribonucleases. *Cell. Mol. Life Sci.* *54*, 795–803.
- Rudolph, B., Podschun, R., Sahly, H., Schubert, S., Schröder, J.M., and Harder, J. (2006). Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 3194–3196.
- Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., and Bevins, C.L. (2003). Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* *422*, 522–526.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *74*, 5463–5467.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* *418*, 191–195.
- Schägger, H., and Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* *166*, 368–379.
- Schroeder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2011). Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human  $\beta$ -defensin 1. *Nature* *469*, 419–423.
- Schutte, B.C., Mitros, J.P., Bartlett, J.A., Walters, J.D., Jia, H.P., Welsh, M.J., Casavant, T.L., and McCray, P.B., Jr (2002). Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 2129–2133.
- Shirazi, T., Longman, R.J., Corfield, A.P., and Probert, C.S. (2000). Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* *76*, 473–478.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76–85.
- Snook, J. (1990). Are the inflammatory bowel diseases autoimmune disorders? *Gut* *31*, 961–963.
- Sørensen, O.E., Follin, P., Johnsen, A.H., Calafat, J., Tjabringa, G.S., Hiemstra, P.S., and Borregaard, N. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* *97*, 3951–3959.

- Stange, E.F. (2004). *Colitis ulcerosa - Morbus Crohn* (Uni-Med, Bremen).
- Strugala, V., Dettmar, P.W., and Pearson, J.P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract.* *62*, 762–769.
- Sur, S., Glitz, D.G., Kita, H., Kujawa, S.M., Peterson, E.A., Weiler, D.A., Kephart, G.M., Wagner, J.M., George, T.J., Gleich, G.J., et al. (1998). Localization of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in neutrophilic leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* *63*, 715–722.
- Taniguchi, N., Caramés, B., Ronfani, L., Ulmer, U., Komiya, S., Bianchi, M.E., and Lotz, M. (2009). Aging-related loss of the chromatin protein HMGB2 in articular cartilage is linked to reduced cellularity and osteoarthritis. *PNAS*.
- Taniguchi, N., Kawahara, K., Yone, K., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., Goto, M., Inoue, K., Yamada, S., Ijiri, K., Matsunaga, S., et al. (2003). High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.* *48*, 971–981.
- Thayer, W.R., Jr (1976). Editorial: Are the inflammatory bowel diseases immune complex diseases? *Gastroenterology* *70*, 136–137.
- Thia, K., Faubion, W.A., Jr, Loftus, E.V., Jr, Persson, T., Persson, A., and Sandborn, W.J. (2011). Short CDAI: development and validation of a shortened and simplified Crohn's disease activity index. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 105–111.
- Thomas, J.O., and Travers, A.A. (2001). HMG1 and 2, and related “architectural” DNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 167–174.
- Tjabringa, G.S., Ninaber, D.K., Drijfhout, J.W., Rabe, K.F., and Hiemstra, P.S. (2006). Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *140*, 103–112.
- Travers, A.A. (2003). Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO Rep.* *4*, 131–136.
- Vitali, R., Stronati, L., Negroni, A., Di Nardo, G., Pierdomenico, M., Del Giudice, E., Rossi, P., and Cucchiara, S. (2011). Fecal HMGB1 is a novel marker of intestinal mucosal inflammation in pediatric inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 2029–2040.
- Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., et al. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* *285*, 248–251.
- Wang, H., Yang, H., Czura, C.J., Sama, A.E., and Tracey, K.J. (2001). HMGB1 as a Late Mediator of Lethal Systemic Inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *164*, 1768–1773.
- Wang, H., Yang, H., and Tracey, K.J. (2004). Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J. Intern. Med.* *255*, 320–331.

- Wehkamp, J., Chu, H., Shen, B., Feathers, R.W., Kays, R.J., Lee, S.K., and Bevins, C.L. (2006). Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Lett.* *580*, 5344–5350.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., et al. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* *53*, 1658–1664.
- Wehkamp, J., Koslowski, M., Wang, G., and Stange, E.F. (2008). Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol 1 Suppl 1*, S67–74.
- Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., et al. (2005). Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn's disease. *PNAS* *102*, 18129–18134.
- Wehkamp, J., Schwind, B., Herrlinger, K.R., Baxmann, S., Schmidt, K., Duchrow, M., Wohlschläger, C., Feller, A.C., Stange, E.F., and Fellermann, K. (2002). Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig. Dis. Sci.* *47*, 1349–1355.
- Wehkamp, J., Wang, G., Kübler, I., Nuding, S., Gregorieff, A., Schnabel, A., Kays, R.J., Fellermann, K., Burk, O., Schwab, M., et al. (2007). The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J. Immunol.* *179*, 3109–3118.
- White, S.H., Wimley, W.C., and Selsted, M.E. (1995). Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *5*, 521–527.
- Wilson, M. (2004). *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease* (Cambridge University Press).
- Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2003). A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* *299*, 2074–2076.
- Yanai, H., Ban, T., Wang, Z., Choi, M.K., Kawamura, T., Negishi, H., Nakasato, M., Lu, Y., Hangai, S., Koshiba, R., et al. (2009). HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* *462*, 99–103.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M., et al. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* *286*, 525–528.
- Yang, D., Liu, Z., Tewary, P., Chen, Q., De la Rosa, G., and Oppenheim, J.J. (2007). Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr. Pharm. Des.* *13*, 3131–3139.
- Yang, D., Rosenberg, H.F., Chen, Q., Dyer, K.D., Kurosaka, K., and Oppenheim, J.J. (2003). Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood* *102*, 3396–3403.

- Yang, D., Tewary, P., De la Rosa, G., Wei, F., and Oppenheim, J.J. (2010). The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 157–163.
- Yang, H., Lundbäck, P., Ottosson, L., Erlandsson-Harris, H., Venereau, E., Bianchi, M.E., Al-Abed, Y., Andersson, U., Tracey, K.J., and Antoine, D.J. (2012). Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol. Med.* 18, 250–259.
- Yang, H., and Tracey, K.J. (2010). Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 149–156.
- Yang, R., Miki, K., Oksala, N., Nakao, A., Lindgren, L., Killeen, M.E., Mennander, A., Fink, M.P., and Tenhunen, J. (2009). Bile high-mobility group box 1 contributes to gut barrier dysfunction in experimental endotoxemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R362–369.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.
- Zetterström, C.K., Bergman, T., Rynnel-Dagöö, B., Erlandsson Harris, H., Söder, O., Andersson, U., and Boman, H.G. (2002). High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid. *Pediatr. Res.* 52, 148–154.
- Zetterström, C.K., Strand, M.-L., and Söder, O. (2006). The high mobility group box chromosomal protein 1 is expressed in the human and rat testis where it may function as an antibacterial factor. *Hum. Reprod.* 21, 2801–2809.
- Zhang, Q., and Wang, Y. (2010). HMG modifications and nuclear function. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 28–36.
- Zhao, C., Wang, I., and Lehrer, R.I. (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett.* 396, 319–322.

## Anhang

### Rekombinante Expression von HMGB2:

NCBI Sequenz ID: CCDS 3816.1

#### Nukleotidsequenz:

```
1   atgggtaaag gagaccccaa caagccgcg  ggcaaaatgt cctcgtacgc
51  cttcttcgtg cagacctgcc ggaagagca  caagaagaaa caccggact
101 cttccgtcaa tttcgcggaa ttctccaaga agtgttcgga gagatggaag
151 accatgtctg caaaggagaa gtcgaagttt gaagatatgg caaaaagtga
201 caaagctcgc tatgacaggg agatgaaaaa ttacgttctt cccaagggtg
251 ataagaaggg gaagaaaaag gacccaatg  ctctaaaag  gccaccatct
301 gccttcttcc tgttttgctc tgaacatcgc ccaaagatca aaagtgaaca
351 ccctggccta tccattgggg atactgcaaa gaaattgggt gaaatgtggt
401 ctgagcagtc agccaaagat aaacaacat  atgaacagaa agcagctaag
451 ctaaaggaga aatatgaaaa ggatattgct gcatatcgtg ccaagggcaa
501 aagtgaagca ggaaagaagg gccctggcag gccaacaggc tcaaagaaga
551 agaacgaacc agaagatgag gaggaggagg aggaagaaga agatgaagat
601 gaggaggaag aggatgaaga tgaagaataa
```

#### AS-Sequenz:

```
1   MGKGDPNKPR GKMSYAFFV QTCREEHKKK HPDSSVNFAE FSKKCSERWK
51  TMSAKEKSKF EDMAKSDKAR YDREMKNYVP PKGDKKGKKK DPNAPKRPPS
101 AFFLFCSEHR PKIKSEHPGL SIGDTAKKLG EMWSEQSAKD KQPYEQKAAK
151 LKEYEKDIA AYRAKGKSEA GKKGPGRPTG SKKKNEPEDE EEEEEDEDED
201 EEEEEDEDEE
```

### Codon-optimierte HMGB2-Nukleotidsequenz:

```
1   GGATCCATGG  GGAAAGGCGA  CCCGAACAAA  CCGCGCGGTA  AAATGTCGTC
51  CTACGCGTTC  TTTGTCCAAA  CGTGTCTGTA  GGAACACAAA  AAAAAACACC
101 CGGACTCTTC  GGTGAACTTT  GCGGAATTTA  GCAAAAAGTG  CTCTGAACGC
151 TGGAAAACCA  TGAGTGCAAA  AGAGAAAAGC  AAATTTGAAG  ATATGGCGAA
201 AAGCGATAAA  GCCCGTTATG  ATCGCGAAAT  GAAGAACTAC  GTTCCACCGA
251 AAGGGGACAA  GAAAGGCAAA  AAAAAAGACC  CGAATGCTCC  CAAACGTCCT
301 CCATCAGCCT  TCTTCCTGTT  TTGCAGTGAA  CATCGCCCGA  AAATCAAAAG
351 CGAACATCCG  GGCTTATCGA  TTGGCGATAC  TGCCAAGAAA  TTGGGAGAAA
401 TGTGGTCAGA  ACAGAGTGCT  AAGGACAAAC  AGCCCTATGA  ACAGAAAGCG
451 GCCAAACTGA  AAGAGAAGTA  CGAGAAAGAT  ATTGCGGCTT  ATCGCGCAAA
501 AGGCAAAAGC  GAAGCAGGAA  AGAAAGGTCC  TGGTCGGCCA  ACCGGTTCCA
551 AAAAGAAGAA  TGAACCGGAG  GATGAAGAAG  AAGAAGAGGA  AGAAGAGGAT
601 GAGGATGAGG  AAGAAGAAGA  TGAGGACGAA  GAATAAAAGC TT
```

Um eine Klonierung in weitere Vektoren zu erleichtern wurde am 5'-Ende eine Schnittstelle für BamH1 und am 3'-Ende eine Schnittstelle für HindIII angehängt. Aufgrund der verwendeten Primer und dem Stopcodon hatten diese keinen Einfluss auf die AS-Sequenz des rekombinant exprimierten HMGB2.

### Rekombinante Expression der HMG-Box A, HMG-Box B und des C-Terminus:

#### AS-Sequenzen:

##### HMG-Box A

```
1  MGKGDPNKPR  GKSSYAFFV  QTCREEHKKK  HPDSSVNFAE  FSKKCSERWK  TMSAKEKSKF
61  EDMAKSDKAR  YDREMKNYVP  PKGD
```

##### HMG-Box B

```
1  GDKKGGKKDP  NAPKRPPSAF  FLFCSEHRPK  IKSEHPGLSI  GDTAKKLGEM  WSEQSAKDKQ
61  PYEQKAAKLK  EKYEKDIAAY  RAKGKSEAGK  KGPR
```

##### C-Terminus

```
1  AGKKGPRPT  GSKKKNPED  EEEEEEEDE  DEEEDEDEE
```

## **Danksagung**

PD Jan Wehkamp danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Möglichkeit diese externe Doktorarbeit durchführen zu können und die hilfreichen Diskussionen sowie den stetigen Optimismus, der zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Prof. Wolfgang Hanke möchte ich mich für die Betreuung bedanken, die mir die Durchführung dieser externen Doktorarbeit ermöglicht hat.

Prof. Eduard Stange danke ich für die Ideen und Diskussionen, die zu der Entwicklung dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Matthias Schwab möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich diese Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie durchführen konnte.

Bei Dr. Björn Schröder möchte ich mich für die fachliche Anleitung, die Hilfe bei der Bewältigung von Problemen des Laboralltags und das Korrekturlesen der Arbeit sehr herzlich bedanken.

Dr. Simon Jäger danke ich für die Beantwortung medizinischer Fragen und den ein oder anderen Kaffee ;)

Dr. Maureen Ostaff danke ich für die hilfreichen Ratschläge und Ideen zur Durchführung diverser Versuche.

Marion Schiffmann, Michelle Katajew, Jutta Bader und Kathleen Siegel möchte ich für die kompetente Hilfe im Labor danken.

Ein besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppen von PD Jan Wehkamp und Prof. Eduard Stange für die hilfreichen Ideen und Vorschläge, die zur Entwicklung dieser Arbeit beigetragen haben sowie die aufbauenden Worte nach missglückten Versuchen. Dank euch habe ich mich am IKP immer sehr wohl gefühlt.

Meiner Familie und Freundin danke ich für den Rückhalt und die Kraft die sie mir geben.