

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Antimikrobielle Aktivität humaner  
Kolonepithelzellen gegenüber *E. coli* Nissle unter  
besonderer Berücksichtigung des Cathelicidins  
LL-37**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Julia Schwab

aus Tauberbischofsheim

Würzburg, August 2012



Referent: Professor Dr. med. W. Scheppach

Koreferent: PD Dr. rer. nat. Dr. med. Christoph U. Schoen

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

20.06.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antimikrobielle Peptide.....	1
1.1.1 Die Cathelicidine .....	2
1.1.2 Das Cathelicidin LL-37 .....	2
1.1.3 Regulation der Expression von LL-37 .....	5
1.1.4 Effekte von LL-37 auf Bakterien .....	5
1.2 Die bakterielle Darmflora.....	7
1.3 <i>E. coli</i> Nissle 1917: ein Gram-negatives probiotisches Bakterium .....	8
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit .....	9
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
2.1 Material .....	11
2.1.1 Geräte .....	11
2.1.2 Chemikalien .....	12
2.1.3 Puffer und Pufferzusätze .....	12
2.1.4 Zellen und Bakterien .....	13
2.1.5 Zellkulturmedien .....	13
2.1.6 Kits.....	13
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Herstellung von LB-Medium .....	14
2.2.2 Herstellung von LB-Agarplatten.....	14
2.2.3 Antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber <i>E. coli</i> Nissle	15
2.2.4 Kultivierung verschiedener Kolonepithelzelllinien .....	16
2.2.5 Koinkubation von <i>E. coli</i> Nissle mit verschiedenen Kolonepithelzelllinien ...	17
2.2.6 Präparation und Aufreinigung der RNA .....	18
2.2.7 DNase-Verdau .....	19
2.2.8 Bestimmung des RNA-Gehalts.....	19
2.2.9 cDNA-Synthese.....	19
2.2.10 Real-Time PCR.....	20
2.2.11 Statistische Analyse .....	22

<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>23</b>
3.1 Antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber <i>E. coli</i> Nissle .....	23
3.2 Antimikrobielle Aktivität von Kolonepithelzellen gegenüber <i>E. coli</i> Nissle mit und ohne Stimulation durch Butyrat .....	27
3.3 <i>camp</i> -Expression in Kolonepithelzellen nach Inkubation mit <i>E. coli</i> Nissle .....	30
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>32</b>
4.1 Antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber <i>E. coli</i> Nissle .....	32
4.2 Antimikrobielle Aktivität von Kolonepithelzellen gegenüber <i>E. coli</i> Nissle mit und ohne Stimulation durch Butyrat .....	34
4.3 <i>camp</i> -Expression in Kolonepithelzellen nach Inkubation mit <i>E. coli</i> Nissle .....	36
4.4 Gesamtbeurteilung der Koinkubationsversuche .....	37
4.5 Mögliche Einsatzgebiete von LL-37 in der Zukunft .....	38
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>39</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>41</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>50</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>51</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Antimikrobielle Peptide

Der menschliche Organismus ist ständig einer großen Anzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren ausgesetzt. Verschiedene Abwehrmechanismen, die miteinander interagieren, verhindern ein Eindringen dieser Mikroorganismen in den menschlichen Körper. Die Schleimhäute als Teil des angeborenen Immunsystems bilden zum einen eine mechanische Barriere zur Außenwelt, zum anderen sind sie mit einer Vielzahl von Effektormolekülen ausgestattet, zu denen auch die Antimikrobiellen Peptide (AMPs, beispielsweise LL-37 und hBD2) gehören (Frohm *et al.* 1997). AMPs sind auf verschiedenen Schleimhautoberflächen eines Organismus zu finden und zeigen eine direkte antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen (Scott *et al.* 2002). Ebenso wirken sie als Mediatoren der Inflammation (Bals, 2000). Sie produzieren Chemokine, stimulieren die Angiogenese, sind wirksam gegen Lipopolysaccharid (LPS) und haben eine direkte chemotaktische Wirkung (Scott *et al.* 2002; Welling *et al.* 1998; Koczulla *et al.* 2003; Fukumoto *et al.* 2005).

Bis heute sind bereits mehr als 1200 AMPs identifiziert worden. Eine Liste findet man unter <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (Lai *et al.* 2009). Mehr als 30 verschiedene AMPs sind bekannt, die im menschlichen Körper zu finden sind (Nijnik und Hancock 2009).

Anhand ihrer Aminosäuresequenzen und weiterer bestimmter Strukturmerkmale können AMPs in verschiedene Familien unterteilt werden. Beim Menschen sind drei Familien bekannt: die Defensine, die Cathelicidine und die Histatine (Bals, 2000).

### 1.1.1 Die Cathelicidine

Cathelicidine sind Proteine, die aus zwei Domänen bestehen, einem N-terminalen Cathelin-Anteil und einem kationischen variablen C-terminalen Anteil mit antimikrobieller Aktivität. Sie werden in Zellen synthetisiert und gespeichert und bei Bedarf gespalten und freigesetzt (Zanetti, 2005).

Cathelicidine interagieren sowohl mit der inneren, als auch mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) und ebenso direkt mit LPS, einem Endotoxin, welches sich auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien befindet und bei deren Zerfall freigesetzt wird (Gutsmann *et al.* 2000; Gutsmann *et al.* 1999). Indem sie LPS neutralisieren, schützen die Cathelicidine den Organismus vor einem endotoxischen Schock (Gough *et al.* 1996). Auch verschiedene Gram-positive Bakterien (z.B. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* und Vancomycin-resistente Enterokokken) reagieren mit Cathelicidinen (Turner *et al.* 1998).

Während man bei einigen Säugetierarten mehrere Gene für Cathelicidine findet (z.B. „CRAMP=cathelin-related antimicrobial peptide“ bei Mäusen und „BMAPs=bovine myeloid antimicrobial peptides“ bei Rindern; Zanetti, 2005), scheint das menschliche Genom nur ein Gen dieser Familie aufzuweisen. Dieses Gen ist das CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide). Es codiert das Präpropeptid hCAP18 („human Cationic Antimicrobial Peptide“ 18 kDa) (Frohm *et al.* 1997), welches in seiner aktiven Form LL-37 genannt wird.

### 1.1.2 Das Cathelicidin LL-37

hCAP18/LL-37 ist das einzige bekannte humane Cathelicidin. Es wurde 1995 von drei Gruppen unabhängig identifiziert (Zanetti, 2005). Zum einen wurde es aus cDNA in myeloischem Knochenmark abgeleitet (Agerberth *et al.* 1995;



Cowland *et al.* 1995; Larrick *et al.* 1995) und zum anderen aus Neutrophilen isoliert (Cowland *et al.* 1995). Der Begriff „hCAP18“ meint das Propeptid, während LL-37 das aus dem Holoprotein freigesetzte Peptid bezeichnet (Zanetti, 2005). LL-37 besteht aus 37 Aminosäureresten mit Leu-Leu am N-Terminus (Gudmundsson *et al.* 1996), was für die Namensgebung verantwortlich ist. Die Spaltung erfolgt nach der Exozytose durch die Serinprotease 3 (Sorensen *et al.* 2001).

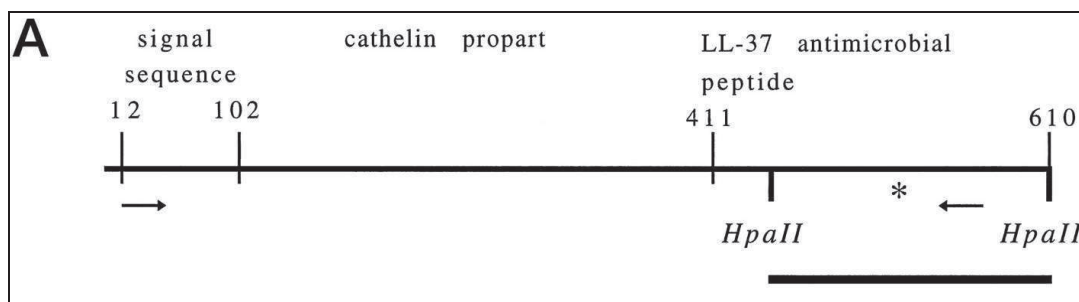


Abb. 1 Schemazeichnung der cDNA des kompletten Präpro-LL-37 (Frohm *et al.* 1997)

LL-37 ist ein positiv geladenes Molekül (+6 bei pH~7,4) mit einem hohen Anteil an basischen und hydrophoben Aminosäuren. Die Struktur ist in wässriger Lösung relativ ungeordnet, kann sich aber nach Kontakt mit der Bakterienwand in eine  $\alpha$ -Helix umwandeln (Nijnik und Hancock 2009).

hCAP-18/LL-37 wird in unreifen Neutrophilen (Sorensen *et al.* 1997) und in verschiedenen Blutzellen gebildet, die an der Inflammation und Immunabwehr beteiligt sind, zum Beispiel in NK-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, B-Zellen, Monozyten (Agerberth *et al.* 2000) und Mastzellen (Di Nardo *et al.* 2003), aber auch in hämatopoetischen Zelllinien und menschlichen Leukämiezellen (Yang Y.H. *et al.* 2003). Darüber hinaus wird dieses Gen auch in der Haut, in den Epithelien der Atemwege, des Mundes, der Zunge, des Ösophagus, des Darms, der ableitenden Harnwege, der Zervix und der Vagina (Frohm Nilsson *et al.* 1999; Bals *et al.* 1998; Hase *et al.* 2002), in Schweiß- und Speicheldrüsen (Murakami *et al.* 2002a, b), im Epithel der Kornea (Kumar *et al.* 2007) sowie in

Nebenhoden und Hoden exprimiert (Agerberth *et al.* 1995; Malm *et al.* 2000; Hammami-Hamza *et al.* 2001).

Man vermutet, dass Cathelicidine, die von Gliazellen produziert werden, auch eine entscheidende Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen des zentralen Nervensystems spielen (Brandenburg *et al.* 2008).

Erniedrigte Konzentrationen von hCAP18/LL-37 gehen mit einem verminderten Schutz vor Infektionen einher. Dies wird beispielsweise deutlich bei Patienten mit Morbus Kostmann, einer schweren angeborenen Neutropenie. Durch den Mangel an LL-37 in den Neutrophilen dieser Patienten kommt es zu einem gehäuften Auftreten von Infektionen (Putsep *et al.* 2002).

Als Antwort auf lokale und systemische Infektionen, aber auch bei inflammatorischen Störungen und anderen Hautkrankheiten wurde in der Haut und in Schleimhautepithelien eine erhöhte Produktion von LL-37 beobachtet (Frohm *et al.* 1997; Dorschner *et al.* 2001; Conner *et al.* 2002; Schaller-Bals *et al.* 2002; Ong *et al.* 2002; Paulsen *et al.* 2003; Kim *et al.* 2003; Jung *et al.* 2003).

Darüber hinaus stimuliert LL-37 die Angiogenese (Koczulla *et al.* 2003), induziert die Proliferation von Lungenepithelzellen (Shaykhiev *et al.* 2005), beschleunigt die Wundheilung des Atemwegsepithels (Shaykhiev *et al.* 2005), führt zur Freisetzung von Zytokinen (z.B. IL-8) und wirkt chemotaktisch (Koczulla *et al.* 2003).

LL-37 ist bereits in einer sehr frühen Entwicklungsstufe des menschlichen Organismus vorhanden: Das Peptid wurde nicht nur bei Neugeborenen, sondern sogar in Fruchtwasser nachgewiesen (Yoshio *et al.* 2003).

Sowohl gereinigtes als auch chemisch hergestelltes LL-37 zeigen vergleichbar starke antimikrobielle Aktivität *in vitro* (Gudmundsson *et al.* 1996, Johansson *et al.* 1998).

### **1.1.3 Regulation der Expression von LL-37**

Die Regulation der Expression von LL-37 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt eine Vielzahl von Reizen, die die Expression steigern, zum Beispiel pro-inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und Bestandteile von Bakterien (Bucki *et al.* 2010).

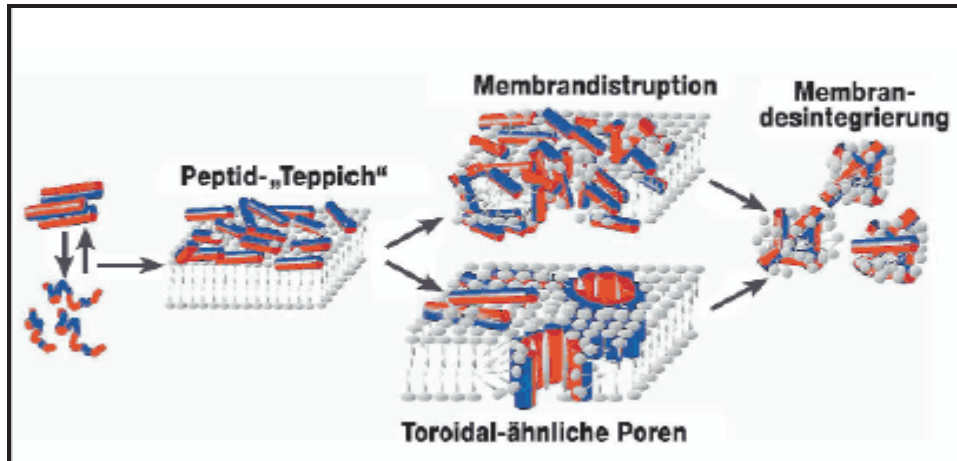
Weiterhin ist bekannt, dass kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat, Isobutyrat, Propionat und Acetat über unterschiedliche Signalwege die Differenzierung von Kolonepithelzellen induzieren und gleichzeitig zeit- und dosisabhängig die LL-37-Expression steigern (Schauber *et al.* 2003). Butyrat scheint verschiedene MAP-Kinasen zu aktivieren. Während ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) durch Aktivierung von MEK (mitogen/extracellular signal protein kinase) die LL-37-Transkription steigert, bewirkt p38 die Induktion der Differenzierung (Schauber *et al.* 2003).

Vitamin D3 in der hormonellen Form [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] induziert die Expression von pro-LL-37 in Monozyten und Makrophagen (Wang *et al.* 2004; Gombart *et al.* 2005).

HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$ ) gehört ebenfalls zu den Faktoren, die die LL-37-Expression regulieren. Eine selektive Inaktivierung des HIF1 $\alpha$  führt zu einer Abnahme der LL-37-Expression in Zellen des Knochenmarks und in Keratinozyten (Peyssonnaud *et al.* 2008).

### **1.1.4 Effekte von LL-37 auf Bakterien**

Die meisten antimikrobiellen Peptide sind kationische (polare) Moleküle mit räumlich getrennten hydrophoben und geladenen Regionen. Diese strukturellen Merkmale sind wichtig für ihren Wirkmechanismus. Es kommt zu einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den kationischen Peptiden und der anionischen Zellmembran der Mikroorganismen. Die Peptide binden an die Zellmembran. Dadurch wird die Membran durchlässig und es kommt zum Zelltod (Bals, 2000).



**Abb. 2** Grafisches Modell der Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden, hier am Beispiel der Defensine. Durch ihre positive Ladung reagieren Defensine mit den negativ geladenen Phospholipid-Gruppen der äußeren Bakterienzellmembran. Über elektrostatische Anziehungskräfte bilden sie einen Peptid-Teppich, der zur Porenbildung und letztendlich Zerstörung der Zellmembran des Mikroorganismus führt. (Aus: Wehkamp J., Fellermann K., Herrlinger K. *et al.*: Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nature Clin Pract* 2005; 2: 406-15)

Die bakterizide Wirkung von LL-37 wurde in verschiedenen Wachstumsmedien gezeigt, zum Beispiel auf Luria-Bertani (LB)-Medium und in Zellkulturmedien. Sie ist abhängig vom pH-Wert und von der Salzkonzentration des Mediums, welche die Sekundärstruktur des Peptids beeinflusst (Agerberth *et al.* 1995). Unter physiologischen Bedingungen spielen wahrscheinlich die immunmodulatorischen Eigenschaften von LL-37 eine bedeutendere Rolle als die antimikrobiellen Eigenschaften (Bowdish *et al.* 2005).

In verschiedenen Studien wurde die bakterizide Wirkung von LL-37 *in vitro* sowohl gegen Gram-positive, also auch gegen Gram-negative Bakterien bereits nachgewiesen, zum Beispiel gegen *Neisseria gonorrhoeae* (Bergman *et al.* 2005), *Helicobacter pylori* (Hase *et al.* 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (Bals *et al.* 1999), *A-Streptokokken* (Nizet *et al.* 2001), *Shigellen* (Islam *et al.* 2001), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Smeianov *et al.* 2000), *Staphylococcus aureus* und *MRSA* (methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; Travis *et al.* 2000).

*In vivo* beeinflussen verschiedene Bakterien die Produktion von LL-37 in unterschiedlicher Weise. *Helicobacter pylori* zum Beispiel bewirkt eine Steigerung der LL-37-Produktion in den Epithelzellen der Magenschleimhaut (Hase *et al.* 2003). *Neisseria gonorrhoeae* hingegen verringert die Freisetzung von LL-37 aus Epithelzellen der Zervix (Bergman *et al.* 2005), und auch *Shigellen* führen zu einer verminderten LL-37-Bildung in infizierten Darmepithelzellen (Islam *et al.* 2001).

In höheren Konzentrationen zeigt LL-37 auch zytotoxische Aktivität gegenüber eukaryotischen Zellen. Das bedeutet, dass LL-37 auch Zellen des Wirts schädigen könnte. Zum Schutz vor solch einem nachteiligen Wirkmechanismus wird die antibakterielle und zytotoxische Aktivität von LL-37 in Anwesenheit von menschlichem Serum gehemmt. Da es keine Anhaltspunkte dafür gibt, dass LL-37 durch menschliches Serum abgebaut wird, ist es möglich, dass seine Wirkung durch Bindung an ein Serumprotein inhibiert wird (Johansson *et al.* 1998).

## 1.2 Die bakterielle Darmflora

Der Magen-Darm-Trakt ist von einer Vielzahl von Bakterien und anderen Mikroorganismen besiedelt. Im Kolon des Menschen findet man ungefähr  $10^{14}$  Bakterien, die bis zu 400 verschiedenen Spezies angehören (Gustafsson *et al.* 1982). Das sind rund zehnmal mehr Bakterien, als der Organismus des Menschen Körperzellen enthält.

Den mit Abstand größten Anteil der menschlichen Darmflora bilden die anaeroben stabförmigen Bakterien. Sie machen mehr als 99% aller Organismen aus. Die häufigsten Spezies sind *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium adolescentis* und *Eubacterium aerofaciens* (Peach, Fernandez, Johnson und Drasar 1974). Den Rest bilden hauptsächlich *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus salivarius* und Laktobazillen. Darüber hinaus gibt es aber noch eine Menge Organismen, die zahlenmäßig nur einen

geringen Anteil der Darmflora darstellen, im Einzelfall aber eine große Bedeutung haben können (M.J. Hill, 1975).

Die Bakterien haben wichtige Funktionen, wie z.B. Immunmodulation, Versorgung des Organismus mit Vitaminen (beispielsweise Vitamin K und B), Unterstützung der Verdauung, Produktion kurzkettiger Fettsäuren und die Versorgung der Darmepithelschicht mit Energie (Butyrat) (Petrof, 2009). Allerdings sind diese Bakterien nicht immer nur nützlich. Sie haben neben ihren gesundheitsfördernden Eigenschaften auch pathogenetische Eigenschaften. Eine gesunde Flora ist in der Lage, eine Kolonisation mit pathogenen Mikroorganismen zu verhindern. Dabei spielen die antimikrobiellen Peptide eine bedeutende Rolle.

### **1.3 *E. coli* Nissle 1917: ein Gram-negatives probiotisches Bakterium**

Probiotika sind von den Vereinten Nationen und der WHO als „lebende Mikroorganismen, die dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bringen, wenn sie in ausreichender Menge vorhanden sind“ definiert (Petrof, 2009).

*Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zur Familie der Enterobacteriaceae und kommt im menschlichen und tierischen Darm vor. Es ist ein säurebildendes, gramnegatives, stäbchenförmiges und fakultativ anaerobes Bakterium. *E. coli* ist Teil der physiologischen Darmflora, kann jedoch außerhalb des Darms Infektionen hervorrufen. Der probiotisch wirksame Stamm *E. coli* Nissle wurde 1917 von dem deutschen Arzt und Wissenschaftler Alfred Nißle aus dem Darm eines Unteroffiziers des Balkankriegs isoliert, nachdem dieser im Gegensatz zu seinen Kameraden nicht an einem Durchfall erkrankt war (Nißle, 1918). Dieser Stamm diente als Grundlage der bereits seit 1917 kommerziell vertriebenen *Mutaflor*-Zubereitung.

Im Gegensatz zu pathogenen *E. coli*-Stämmen, welche beim Menschen Krankheiten hervorrufen können, fehlen dem probiotisch wirksamen Stamm *E.*

*E. coli* Nissle 1917 viele Virulenzfaktoren. Darüber hinaus besitzt *E. coli* Nissle 1917 verschiedene Faktoren, die ihm einen Überlebensvorteil sowohl gegenüber pathogenen, als auch gegenüber nicht pathogenen *E. coli*-Stämmen verleihen (Schultz, 2008). Die Mechanismen, über die *E. coli* Nissle seine anti-inflammatorischen Effekte ausübt, sind noch immer Gegenstand aktueller Untersuchungen (Petrof, 2009).

Es wurde bereits gezeigt, dass intestinale Epithelzellen mit Hilfe von *E. coli* Nissle die Anheftung und das Eindringen verschiedener bakterieller Pathogene verhindern können (Altenhoefer *et al.* 2004). Weiterhin fand man heraus, dass eine Assoziation zwischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und niedrigen Defensin-Spiegeln besteht (Ramasundara *et al.* 2009). *E. coli* Nissle bewirkt eine Steigerung der hBD-Expression (Wehkamp *et al.* 2004, Schlee *et al.* 2007). Dies könnte ein Mechanismus sein, der zur therapeutischen Wirksamkeit von *E. coli* Nissle bei der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa beiträgt. Bereits in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass *E. coli* Nissle und Mesalazin zur Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa gleichwertig sind (Schultz, 2008; Kruis *et al.* 1997 und 2004; Rembacken *et al.* 1999).

#### **1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Der Magen-Darm-Trakt ist von einer Vielzahl von Bakterien und anderen Mikroorganismen besiedelt, die teilweise auch pathogene Eigenschaften besitzen. Eine gesunde Flora ist in der Lage, eine Kolonisation mit pathogenen Mikroorganismen zu verhindern, wobei die antimikrobiellen Peptide eine bedeutende Rolle spielen.

Allerdings fehlten bisher Studien, die die Zusammenhänge zwischen der Expression von antimikrobiellen Peptiden und der antimikrobiellen Aktivität von menschlichen Koloneptihelzellen untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von synthetischem LL-37 auf das Wachstum von *E. coli* Nissle *in vitro* geprüft. Zusätzlich wurde die *camp-*

Expression verschiedener Kolonepithelzelllinien nach Koinkubation mit Butyrat und *E.coli* Nissle untersucht und die Ergebnisse mit der antimikrobiellen Aktivität dieser Zelllinien in Beziehung gesetzt.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Abzug	Köttermann, Typ 2-453 GAND
Bakterienschüttler	Certomat, B. Braun GmbH
Brutschrank	Heraeus, Function Line Typ B12, 72° C max
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
iCycler	BioRad
Inkubationsschrank CO <sub>2</sub>	Hera Cell, Heraeus
Kühlzentrifugen	Function Line Labofuge 400R, Heraeus Heraeus, 5000 1/min
	Sorvall RC 5B Plus, DuPont
Pipettierhilfe	Brand, accu-jet pro
Spectrophotometer	Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro
Tischzentrifuge	Heraeus, Biofuge fresco 1/min 13000 max.
Vortexer	Heidolph, Type Reax 1/min 2100
	IKA, MS2 Minishaker 1/min 2500, Staufen
	IKA, MS1 Minishaker 1/min 2500, Staufen
	Bender & Hobein AG, Modell II 550 GE
Wasserbäder	GFL, Type 1002
	Gelaire, BSB 4

### 2.1.2 Chemikalien

Agar	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bactotrypton	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Butyrat	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DEPC	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	J. T. Baker
Hefeextrakt	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
LL-37	PanTecs (PA-AMP-004)
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trifast	Peqlab, Erlangen, Deutschland

### 2.1.3 Puffer und Pufferzusätze

Beta-Mercapto	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RDD Buffer	Qiagen
RLT Buffer	Qiagen
RPE Buffer	Qiagen
RW 1 Buffer	Qiagen

#### 2.1.4 Zellen und Bakterien

<i>E. coli</i> Nissle	Zur Verfügung gestellt von Infektionsbiologie Universität Würzburg
Geki-2	Gastroenterologisches Forschungslabor Uniklinik Würzburg
HT-29	ATCC HTB-38
SW 620	ATCC CCL-227
T84	ATCC CCL-248

#### 2.1.5 Zellkulturmedien

DMEM	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EGF 20%	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FBS 10%	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ham's Nutrient Mixture F-12	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HEPES Puffer 0,4%	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MEM	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NEAA 1%	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TGFα 5%	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland

#### 2.1.6 Kits

GAPDH-PDAR- Housekeeping-Kit	Applied Biosystems
iScript Kit	BioRad
RNeasy MiniKit	Qiagen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung von LB-Medium

Zur Erstellung von einem Liter LB-Nährmedium werden folgende Substanzen benötigt:

Gesamtvolumen	1 L
10 g	NaCl
10 g	Bactotrypton
5 g	Hefe-Extrakt
ad 1 L	H <sub>2</sub> O

Anschließend erfolgt das Autoklavieren der Lösung.

### 2.2.2 Herstellung von LB-Agarplatten

Zum Erstellen von LB-Agarplatten wird das LB-Medium nach obiger Anleitung gemischt. Bevor das Medium autoklaviert wird, werden zusätzlich noch 15 g/l Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren lässt man das Medium auf ca. 60° C abkühlen (handwarm). Anschließend wird das Medium unter dem Abzug auf runde oder viereckige Petrischalen gegossen. Man lässt die Platten erkalten und verwendet sie entweder direkt oder lagert sie, möglichst luftdicht verschlossen, im 4° C Raum. Hierbei verhindern die luftdichte Verpackung und die Kühle das Austrocknen des Mediums.

### 2.2.3 Antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle

Die Sensibilität von *E. coli* Nissle gegenüber synthetischem LL-37 wurde bestimmt, indem die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten („colony-forming units“=cfu) ermittelt wurde, welche über Nacht in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von LL-37 gewachsen waren.

*E. coli* Nissle (1 Impföse) wurde am Vorabend in 3 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 50 µl dieser Kultur in 5 ml LB-Medium gegeben (1:100 Verdünnung) und wiederum bei 37°C im Schüttler bis zur OD (optischen Dichte)<sub>595</sub> = 0,3 (gemessen im Photometer) inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde anschließend 5 Minuten bei 13000 rpm (= rounds per minute) zentrifugiert, das Pellet in 1 ml PBS (phosphat buffered saline) gewaschen und nochmals 2 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert. 5 µl dieser Bakteriensuspension (ca.  $5 \cdot 10^7$  Bakterien) wurden in 1,5 ml Eppendorf-Caps gegeben, die bereits 20 µl Peptidlösung in verschiedenen LL-37-Konzentrationen (0µM, 0,25µM, 0,5µM, 1µM, 2µM, 4µM und 8µM) enthielten. LL-37 wurde in 5% DMSO gelöst. Um die verschiedenen Konzentrationen von LL-37 zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen in PBS hergestellt. Der Stamm *E. coli* Nissle wurde mit den unterschiedlich konzentrierten LL-37-Lösungen von 0 µM (Kontrolle) bis 8 µM 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) als die kleinste Peptidkonzentration bestimmt, die das Wachstum der Bakterien im Vergleich zur LL-37-freien Kontrolle signifikant reduzieren konnte. Die minimale bakterizide Konzentration (MBC) ist definiert als die kleinste Peptidkonzentration, bei der kein Bakterienwachstum mehr stattfindet. Die MIC- und MBC-Werte des antimikrobiellen Peptids LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle wurden bestimmt, indem man nach der 60-minütigen Inkubation 25 µl des LL-37-Bakteriengemisches in das jeweilige „well“ 1 einer sterilen „96-well Polypropylen Mikrotiterplatte“ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gegeben und eine Verdünnungsreihe mit PBS bis  $10^{-12}$  angelegt

hat. Zur Auswertung wurden schließlich 5 µl aus jedem well auf LB-Agarplatten auspipettiert.

Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden jeweils die sichtbaren cfu ausgezählt. Die Anzahl der überlebenden Bakterien wurde in Prozent im Verhältnis zur Kontrolle angegeben [(cfu nach Inkubation mit LL-37)/(cfu nach Inkubation ohne LL-37)×100].

Auf gleiche Weise wurde die antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 mit Salz-Zusatz (25 mM NaHCO<sub>3</sub>) getestet.

#### **2.2.4 Kultivierung verschiedener Kolonepithelzelllinien**

In dieser Arbeit wurden vier unterschiedliche Kolonepithelzelllinien verwendet. Drei davon waren Zelllinien kolorektaler Karzinome: SW 620, HT-29 und T84. Die vierte Linie war die Adenomzelllinie Geki-2 (Menzel *et al.* 2004). Die Zelllinie SW 620 stammt aus einer Lymphknotenmetastase eines kolorektalen Adenokarzinoms, die Linie HT-29 vom Primärtumor eines Adenokarzinoms einer 44-jährigen Frau von 1964. Die Zellen der Linie T84 wurden aus einer Lungenmetastase eines Kolonkarzinoms bei einem 72-jährigen Mann gewonnen. All diese Zelllinien haben große Bedeutung bei der Erforschung von Kolonkarzinomen und der Physiologie von Darmepithelzellen. Dennoch sind sie nicht repräsentativ für „normale“ Kolonepithelzellen, da sie über eine lange Zeit in Kultur gewesen sind und deshalb zusätzlich zu ihren karzinomatösen Eigenschaften Veränderungen aufweisen können, die Artefakte der Zellkultur darstellen, wie zum Beispiel Chromosomenaberrationen. Daher wurde zusätzlich zu den bewährten Zelllinien der kolorektalen Karzinome die stabile Kolonadenomzelllinie Geki-2 verwendet. Diese stammt aus einem Kolonadenom einer 56-jährigen Frau und ist sehr interessant für *in vitro*-Versuche zur Entstehung von Kolonkarzinomen und ihrer Prävention (Menzel *et al.* 2004). Die Zelllinien wurden jeweils einschichtig gezüchtet. Die SW 620-Zellen wurden in Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) gezüchtet. Die HT-29-Zellen wurden in Minimum Essential

Medium (MEM), versetzt mit 10% FBS, 0,4% HEPES Puffer, 1% NEAA und 2 mmol/l L-Glutamin kultiviert. Die Züchtung der T84-Zellen erfolgte in DMEM mit „Ham’s Nutrient Mixture F-12“ (1:1), versetzt mit 10% FBS und 2 mmol/l L-Glutamin. Die Zelllinie Geki-2 wurde in DMEM, versetzt mit 1% MEM-Vitamin, 10% FBS, 20% EGF (epidermal growth factor) und 5% TGF $\alpha$  kultiviert. Alle Zellkulturmedien wurden ohne Penicillin und Streptomycin angelegt. Die Zelllinien wurden in 6-well-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) in befeuchteter Umgebung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, bis ungefähr 70% Konfluenz zur Weiterbehandlung erreicht wurde.

### **2.2.5 Koinkubation von *E. coli* Nissle mit verschiedenen Kolonepithelzelllinien**

Um die antimikrobielle Aktivität der verschiedenen Zelllinien (SW 620, HT-29, T84 und Geki-2) zu untersuchen, wurden Koinkubationsversuche durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Bakterien in einem ersten Ansatz in dem jeweiligen Zellkulturmedium 4 Stunden inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Bakterien 4 Stunden in Anwesenheit der verschiedenen Zelllinien in dem entsprechenden Zellkulturmedium inkubiert. Dies wurde wie folgt durchgeführt: Die Zellen wurden bis zur 70%igen Konfluenz angezüchtet und mit sterilem PBS gewaschen. Ca. 1 ml eines Gemisches, bestehend aus LB-Medium und dem entsprechenden Zellkulturmedium (Verhältnis 1:1), welches ungefähr 10<sup>8</sup>/ml *E. coli* Nissle enthielt, wurde hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Hälfte der Zellkulturmedien wurde jeweils 48 Stunden vor Inokulation der *E. coli* Nissle Bakterien mit Butyrat (Endkonzentration: 4mM) versetzt. Es wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten bis 10<sup>-12</sup> angelegt, wie bereits unter 2.2.3 erläutert. Zur Koloniezahlbestimmung wurden je 5  $\mu$ l auf spezielle Agarplatten getropft und diese über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die cfu ausgezählt.

## 2.2.6 Präparation und Aufreinigung der RNA

Mit Hilfe von Trifast wurde nach den Anweisungen des Herstellers RNA aus den jeweiligen Zellfraktionen isoliert. Hierfür wurde jeweils 1 ml Trifast pro well auf die Zellen gegeben. Nach 15 min Einwirkzeit bei Raumtemperatur löste man mit einem Zellschaber die noch adhärenen Zellen. Das so gewonnene Zellsuspensat wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder sofort wie folgt weiterverarbeitet:

Zur Phasentrennung wurden pro Ansatz 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 15 s lang gevortext. Danach inkubierte man die Proben 10 min bei Raumtemperatur und zentrifugierte sie 5 min lang bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 rpm, wodurch eine Phasenauftrennung erfolgte. Die obere wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist, wurde abpipettiert und in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Cap übertragen. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol. Die Proben wurden gevortext, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 10 min bei 13000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Isopropanolüberstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen (5 min bei 13000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$ ). Anschließend wurde das Pellet 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 100  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst, in welchem der RNase Inhibitor DEPC (Diethylpyrocarbonat) im Verhältnis 1:1000 enthalten war.

Zur Aufreinigung der RNA wurde das RNeasy MiniKit von Qiagen verwendet. Pro 100  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung wurden 350  $\mu\text{l}$  vom Puffer RLT zugegeben, der zuvor mit 10  $\mu\text{l}$  beta-Mercapto pro ml Puffer versetzt worden war. Im Anschluss wurden 250  $\mu\text{l}$  abs. Ethanol zugefügt, der Ansatz unter Mischen auf eine RNeasy Säule gegeben und 1 min bei 10000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Es folgte die Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  vom Puffer RW1 und eine weitere Zentrifugation bei 10000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  für 1 min. Das Eluat wurde wiederum verworfen.



### **2.2.7 DNase-Verdau**

Für den DNase-Verdau wurde ein RNase freies DNase Set (RNeasy, Qiagen) verwendet. Auf jede Säule wurde ein Gemisch aus 10 µl DNase Stammlösung und 70 µl Puffer RDD gegeben und vorsichtig gemischt. Dieser DNase-Mix wurde auf die Fritte getropft und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden nochmals 350 µl vom Puffer RW1 zugegeben, 1 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die Säule wurde in ein neues 2 ml Gefäß gesetzt und mit 500 µl Puffer RPE versetzt, worauf wiederum eine einminütige Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C erfolgte. Nach Wiederholung des Waschschriffs wurde die Säule durch zweimaliges Zentrifugieren von je 2 min bei 13000 rpm getrocknet. Die Säule wurde anschließend zur Elution in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap eingesetzt. 30 µl DEPC-Wasser wurden zupipettiert und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

### **2.2.8 Bestimmung des RNA-Gehalts**

Zur Bestimmung des RNA-Gehalts wurden die Proben 1:100 verdünnt und die Extinktion mit einem Photometer bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Die Konzentration der RNA wurde aus der  $OD_{260}$  bestimmt. Das Verhältnis der  $OD_{260}/OD_{280}$  charakterisiert den Reinheitsgrad der Probe. Als proteinfrei gilt ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

### **2.2.9 cDNA-Synthese**

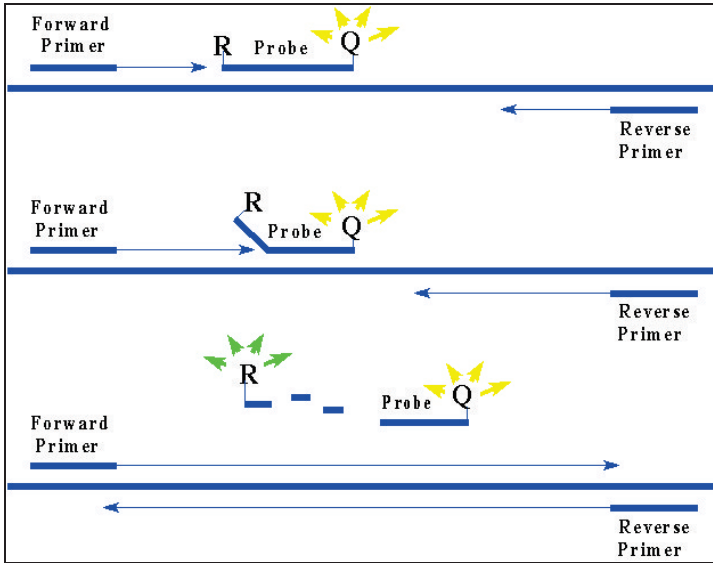
Für die reverse Transkription der RNA wurde das iScript Kit von BioRad verwendet. 1 µg der zellulären RNA wurde jeweils zu 1 µl iScript Reverse Transcriptase und 4 µl iScript Reaktionsmix gegeben. Das Gemisch wurde mit RNase freiem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die cDNA-Synthese erfolgte im PCR-Block (GeneAmp® PCR System 9700) nach folgendem

Programm: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 85°C und Abkühlen der Proben auf 4°C.

### **2.2.10 Real-Time PCR**

Durch real-time PCRs kann die Menge einer definierten mRNA bestimmt werden. Die cDNA diente als Template für die real-time PCR, für die ein iCycler-Gerät von BioRad eingesetzt wurde. Die Menge an amplifizierter DNA wird dabei über Fluoreszenzfarbstoffe (VIC für GAPDH, FAM für LL-37) gemessen, die durch die Polymerase von den Oligonucleotiden bei der DNA-Synthese freigesetzt werden. Die Fluoreszenz nimmt also proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Als Vergleichswert für die Messung der LL-37-mRNA wurde als Referenzgen das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Ein Haushaltsgen ist ein Gen, welches - im Gegensatz zu den regulierten Genen - unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird. Es wurde das GAPDH-PDAR-Housekeeping-Kit eingesetzt, welches keine GAPDH Pseudogene amplifiziert.

Für die Auswertung wurden mit Hilfe der threshold cycle line die C(t)-Werte der einzelnen Proben bestimmt und die Werte für die LL-37-mRNA mit denen für GAPDH verglichen. Der C(t)-Wert ist umso kleiner, je mehr cDNA in einer Probe vorlag, also je mehr mRNA für das Protein am Anfang zur Verfügung stand.



*Abb. 3 Prinzip der Real-time PCR*

Zusätzlich zu den beiden Primern, die in jeder PCR vorhanden sind, befindet sich eine Probe, die an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet und mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist, in dieser Reaktion. Wenn die beiden Fluoreszenzfarbstoffe durch die Probe nahe zusammen sind, wird nach Anregung durch einen Argon-Laser die Energie des Reporterfarbstoffes (R) auf den Quencherfarbstoff (Q) übertragen und nur dieser emittiert Licht. Während der PCR werden beide Primer mittels der Taq-Polymerase so lange verlängert, bis sie auf die Probe treffen. Dort wird dann die Probe von dem DNA Strang gelöst und mit Hilfe der 5' Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Das Resultat ist, dass die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nicht mehr zusammen sind und somit kein Energietransfer mehr stattfinden kann. Es können nun also beide Fluoreszenzfarbstoffe Licht emittieren. ( aus: [www.vu-wien.ac.at/i123/virokurs/RT-PCRkurs.html](http://www.vu-wien.ac.at/i123/virokurs/RT-PCRkurs.html))

Die Ansätze für den Mastermix setzten sich jeweils wie folgt zusammen:

#### **Mastermix GAPDH**

11,25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
12,5 µl Universal-Mastermix  
1,25 µl 20x Sondenmix (PDAR G3)

#### **Mastermix CAMP**

5,0 µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
12,5 µl Universal-Mastermix  
2,5 µl CAMP-vorwärts (Sequenz: 5'-TCG GAT GCT AAC CTC TAC CG-3')  
2,5 µl CAMP-rückwärts (Sequenz: 5'-GAA GGA CGG GCT GGT GAA G-3')  
2,5 µl CAMP-Sonde (Sequenz: 5'-FAM-TGT TAT CCT TAT CAC AAC TGA T-3')

Pro Ansatz wurden 96 µl Mastermix und 4 µl cDNA in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Dann wurden je 25 µl des Mastermix/cDNA-Gemisches in eine 96-well Platte pipettiert. Die Wells wurden verschlossen, die Platte in Alufolie eingewickelt und anschließend entweder sofort zum iCycler gebracht oder über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.11 Statistische Analyse**

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der cfu-Assays wurde der student's t-test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  angenommen, als hochsignifikant  $p < 0,001$ . Die dargestellten Graphen zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung (SD).

Die Daten der RT-PCR wurden in Microsoft Excel ausgewertet. Die Analyse erfolgte mittels  $\Delta\text{-}\Delta\text{-ct}$ -Methode.

## 3 Ergebnisse

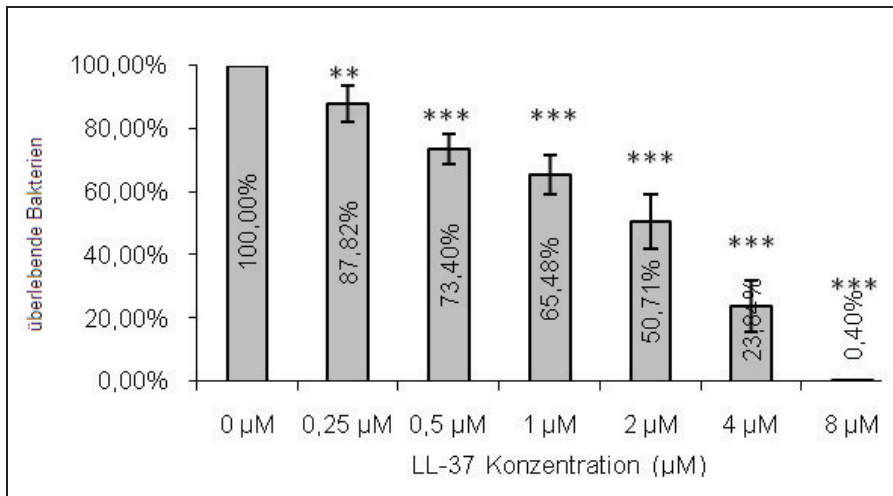
### 3.1 Antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle

Die antimikrobielle Aktivität von LL-37 gegenüber verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die antimikrobielle Aktivität von LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle in Abhängigkeit von dessen Konzentration *in vitro* getestet. Hierzu wurde ein cfu-Assay durchgeführt, wie unter 2.2.3 beschrieben. *E. coli* Nissle wurde mit verschiedenen Konzentrationen (0  $\mu\text{M}$  bis 8  $\mu\text{M}$ ) von synthetischem LL-37 für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgten das Erstellen von Verdünnungsreihen der unterschiedlich konzentrierten Inkubationsgemische und das Ausplattieren auf LB-Agar-Platten. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die überlebenden Bakterienkolonien ausgezählt.

Es wurden die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) und die minimale bakterizide Konzentration (MBC) bestimmt. Die MIC ist die kleinste Peptidkonzentration, welche das Wachstum der Bakterien im Vergleich zur LL-37-freien Kontrolle signifikant reduzieren konnte. Die MBC ist definiert als die kleinste Peptidkonzentration, bei der kein Bakterienwachstum mehr stattfindet.

Als MIC für *E. coli* Nissle wurde eine LL-37-Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  bestimmt. Die MBC, bei der alle Bakterien abgetötet werden, liegt für *E. coli* Nissle bei 8  $\mu\text{M}$  LL-37 (Abb. 4).

## MIC und MBC von LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle



**Abb. 4 Antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle**

*E. coli* Nissle wurde in Anwesenheit der angezeigten LL-37 Konzentrationen für 1h bei 37°C inkubiert. Verschiedene Verdünnungen der inkubierten Bakteriensuspensionen wurden auf Agarplatten ausplattiert und am nächsten Tag ausgewertet. Die Anzahl der überlebenden Bakterien wurde prozentual relativ zur Kontrolle (0 µM) dargestellt. Die "minimal inhibitory concentration" (MIC) für LL-37 beträgt für *E. coli* Nissle 0,25 µM. Die "minimal bactericidal concentration" (MBC), in der alle Bakterien abgetötet werden, liegt für *E. coli* Nissle bei 8 µM. Die Werte wurden mit dem Student's t-test analysiert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD, n=12; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

## LD<sub>50</sub> von LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle

Die letale Dosis von LL-37, bei der 50% der Bakterien abgetötet werden (LD<sub>50</sub>), beträgt 2,2 µM (Abb. 5).

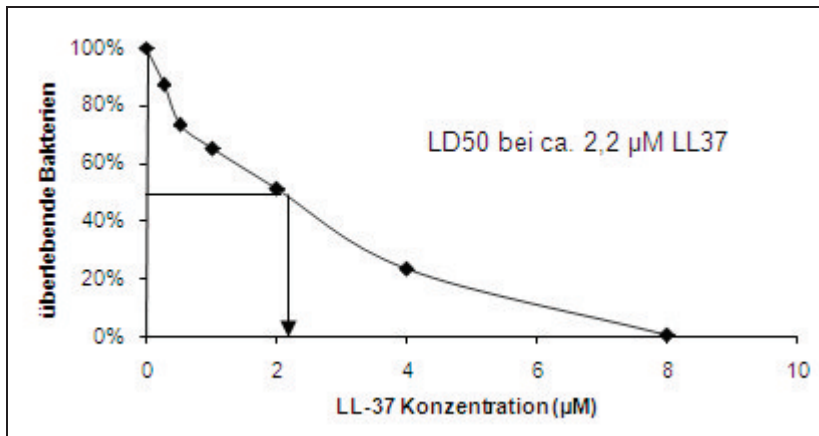


Abb. 5 Die letale Dosis, bei der 50% der Bakterien abgetötet werden (LD<sub>50</sub>) liegt für *E.coli* Nissle bei 2,2 µM. Die Werte wurden mit dem Student's t-test analysiert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD, n=12.

Dieser Versuch zeigte deutlich die bakterizide Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle *in vitro*.

Um festzustellen, ob sich die antimikrobielle Aktivität von LL-37 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration ändert, führten wir die gleichen Versuche in einer 25mM Natriumbicarbonatlösung durch.

## Antimikrobielle Aktivität von LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle in 25mM Natriumbicarbonat

Es zeigt sich eine deutliche Steigerung der antimikrobiellen Aktivität von LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle im Vergleich zum Versuch ohne Natriumbicarbonat (Abb. 6). In einem Umgebungsmilieu von 25 mM Natriumbicarbonat liegt die MIC

bei 0,25  $\mu\text{M}$ . Die MBC betragt hier 4  $\mu\text{M}$  (im Gegensatz zu 8  $\mu\text{M}$  ohne Natriumbicarbonat).

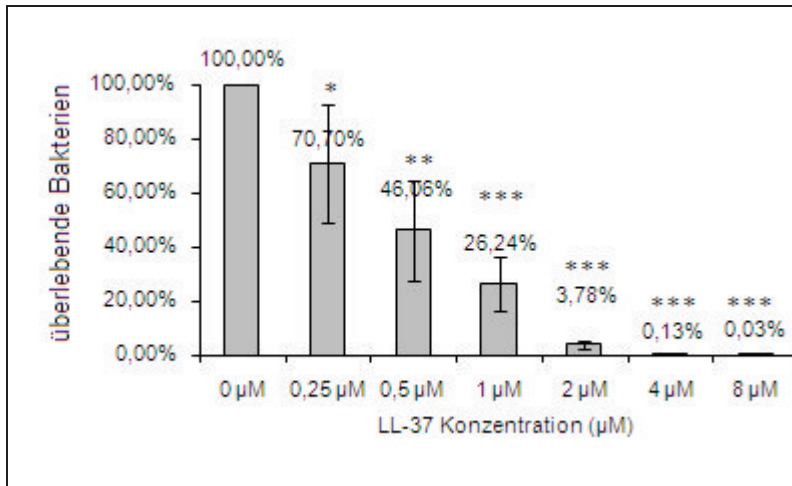


Abb. 6 *E. coli* Nissle wurde in Anwesenheit der angezeigten LL-37 Konzentrationen in einer Natriumbicarbonat-Konzentration von 25 mM für 1h bei 37°C inkubiert. Verschiedene Verdünnungen der inkubierten Bakteriensuspensionen wurden auf Agarplatten ausplattiert und am nächsten Tag ausgewertet. Die Anzahl der überlebenden Bakterien wurde prozentual relativ zur Kontrolle (0  $\mu\text{M}$ ) dargestellt.

Die "minimal inhibitory concentration" (MIC) in 25 mM Natriumbicarbonat betragt 0,25  $\mu\text{M}$ . Die "minimal bactericidal concentration" (MBC), in der alle Bakterien abgetötet werden, liegt in 25 mM Natriumbicarbonat bei 4  $\mu\text{M}$ . Die Werte wurden mit dem Student's t-test analysiert. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD, n=12; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.



### LD<sub>50</sub> von LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle in 25 mM Natriumbicarbonat

Die LD<sub>50</sub> liegt in einer 25 mM Natriumbicarbonatlösung bei ca. 0,5 µM (ohne Natriumbicarbonat bei 2,2 µM).

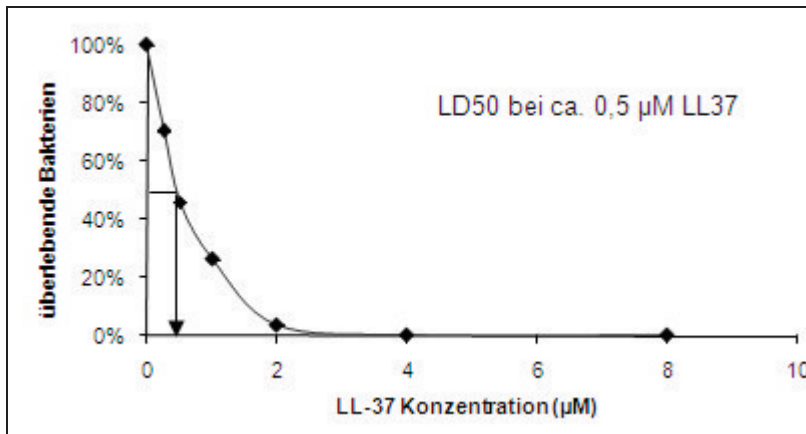


Abb. 7 Die letale Dosis, bei der 50% der Bakterien abgetötet werden (LD<sub>50</sub>), liegt für *E. coli* Nissle in 25 mM Natriumbicarbonat bei ca. 0,5 µM.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle *in vitro* in Anwesenheit von Natriumbicarbonat deutlich verbessert wird:

Salzkonz. (mM)	LD50 (µM LL-37)	MIC (µM LL-37)	MBC (µM LL-37)
0	2,2	0,25	8
25	0,5	0,25	4

### 3.2 Antimikrobielle Aktivität von Kolonepithelzellen gegenüber *E. coli* Nissle mit und ohne Stimulation durch Butyrat

Das Oberflächenepithel des Gastrointestinaltraktes bildet zum Schutz vor potenziell pathogenen Mikroorganismen sowohl eine physikalische, als auch eine chemische Barriere. Dies gelingt unter anderem durch die Produktion von

Effektormolekülen wie den antimikrobiellen Peptiden. Es wurde bereits gezeigt, dass menschliche Kolonepithelzellen das AMP LL-37/hCAP18 bilden und in das Darmlumen sezernieren (Harder *et al.* 1997) und dass dieses Peptid ebenso von den Haupt- und Parietalzellen der Magenmukosa sezerniert wird (Hase *et al.* 2003).

Um die antimikrobielle Aktivität der Kolonpeithelzellen gegenüber *E. coli* Nissle zu analysieren, wurde ein weiterer Infektionsassay durchgeführt. Die Zelllinien SW 620, HT-29, T84 und Geki-2 wurden jeweils mit *E. coli* Nissle beimpft und vier Stunden lang bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden auf die gleiche Weise *E. coli* Nissle-Bakterien ohne Zellen inkubiert. Danach wurden wiederum Verdünnungsreihen erstellt und jeweils 5 µl auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung der überlebenden Bakterienkolonien (Abb. 8).

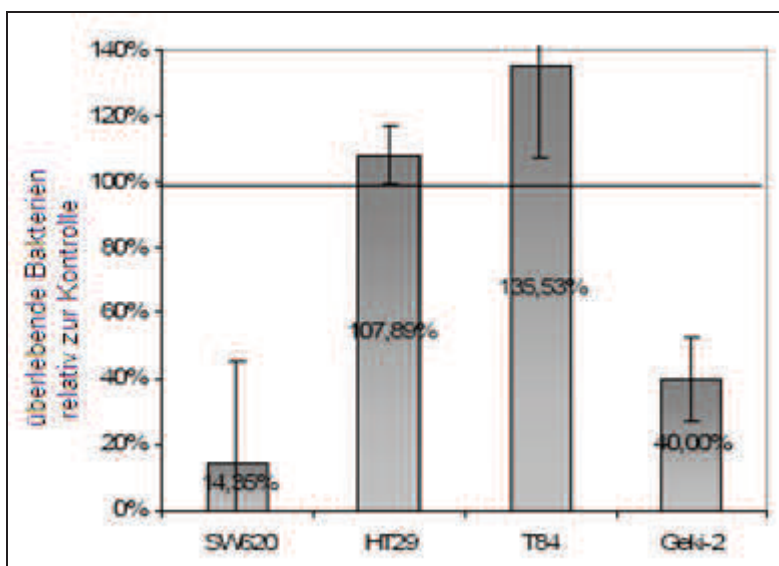


Abb. 8 Die Zelllinien SW 620, HT-29, T84 und Geki-2 wurden mit *E. coli* Nissle beimpft und für 4 h bei 37°C in Anwesenheit von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Verschiedene Verdünnungsstufen wurden auf Agarplatten ausplattiert und die cfu am nächsten Tag durch Auszählen bestimmt. Die Anzahl der überlebenden Bakterien ist relativ zur Kontrolle (Bakterien ohne Zellen) dargestellt. Das bakterielle Wachstum wurde durch Inkubation mit den Zellen SW 620 und Geki-2 signifikant inhibiert.

Die Ergebnisse wurden für die statistische Relevanz mit dem Students t-test analysiert. Die Werte sind Mittelwerte ±SD; n=31 (Geki-2); n=36 (SW 620); n=21 (T84); n=24 (HT-29).

Es ist bekannt, dass verschiedene kurzkettige Fettsäuren, vor allem Butyrat, die *camp*-Expression in Kolonepithelzelllinien modulieren (Hase *et al.* 2002; Schauber *et al.* 2003). Die Inkubation mit Butyrat führt zu einer zeit- und dosisabhängigen Steigerung der LL-37-mRNA-Expression (Schauber *et al.* 2003). Die wirksamste Induktion der *camp*-Expression wird bei einer Butyrat-Konzentration von 4mM nach 48stündiger Inkubation beobachtet (Schauber *et al.* 2003). Ein zusätzlicher Infektionsassay wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob die antimikrobielle Aktivität der Kolonepithelzellen gegenüber *E.coli* Nissle nach Stimulation mit Butyrat steigt. Hierfür wurden die Zelllinien SW 620, HT-29, T84 und Geki-2 für 48 Stunden mit Butyrat (4mM) inkubiert, bevor sie mit *E. coli* Nissle beimpft wurden. Zur Kontrolle wurden *E. coli* Nissle-Bakterien zusammen mit Butyrat, aber ohne Zellen inkubiert (Abb. 9). Die Kontrollen wurden jeweils gleich 100% gesetzt.

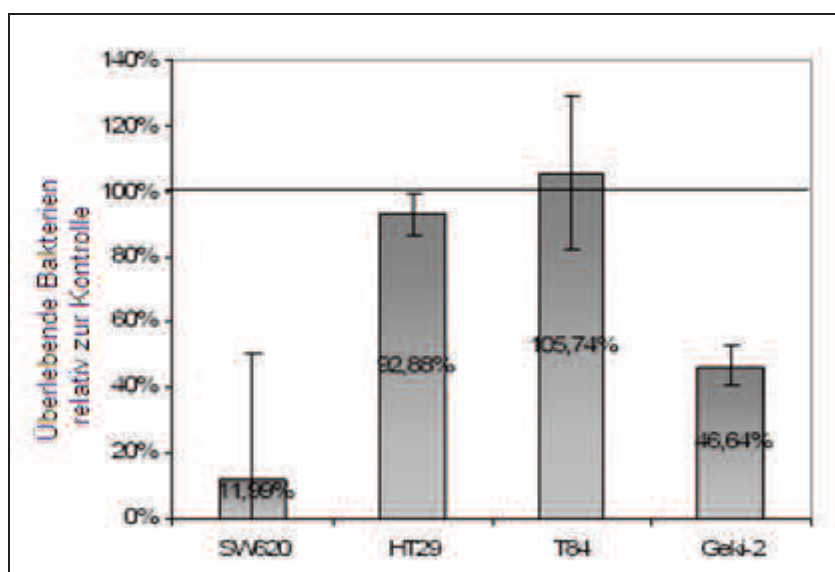


Abb. 9 Nach Inkubation mit Butyrat (4mM, 48h) wurden die Zellen SW 620, HT-29, T84 und Geki-2 mit *E. coli* Nissle beimpft und für 4 h bei 37°C in Anwesenheit von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und wie bei Abb. 8 beschrieben analysiert. Das bakterielle Wachstum wurde durch Inkubation mit den Zellen SW 620 und Geki-2 signifikant inhibiert, aber einen signifikanten Unterschied zu den Zellen ohne Butyratbehandlung konnte man nicht feststellen. Stimuliert man die Zellen HT-29 und T84 zusätzlich mit Butyrat, so lässt sich keine signifikant vermehrte Inhibition feststellen.

Die Ergebnisse wurden für die statistische Relevanz mit dem Students t-test analysiert. Die Werte sind Mittelwerte ±SD; n=31 (Geki-2); n=36 (SW 620); n=21 (T84); n=24 (HT-29).

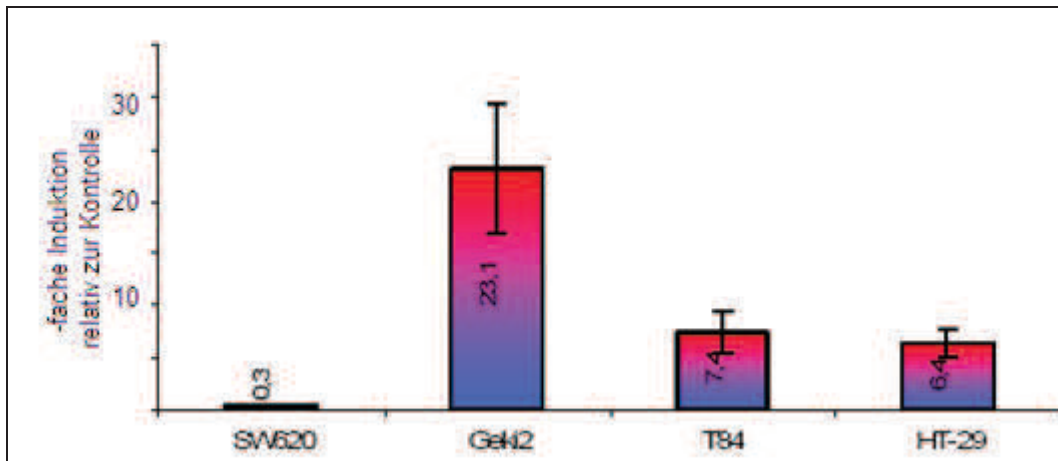
Die Inkubation der Kolonepithelzelllinien HT-29 und T84 mit *E. coli* Nissle zeigt keinen signifikanten Effekt auf das bakterielle Wachstum. Durch Inkubation mit den Zellen SW 620 und Geki-2 hingegen wurde das bakterielle Wachstum signifikant inhibiert.

Eine zusätzliche Stimulation mit Butyrat zeigt keine Steigerung der antimikrobiellen Aktivität der Zelllinien gegenüber *E. coli* Nissle im Vergleich mit den Medium behandelten Kontrollzellen:

Zelllinie	überlebende Bakterien ohne Butyrat	überlebende Bakterien mit Butyrat
SW 620	14,35%	11,99%
Geki-2	40,00%	46,64%
HT29	107,89%	92,88%
T84	135,53%	105,74%

### 3.3 *camp*-Expression in Kolonepithelzellen nach Inkubation mit *E. coli* Nissle

Weitere Infektionsassays wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob die Inkubation von Kolonepithelzellen mit *E. coli* Nissle die *camp*-Expression in diesen Zellen beeinflusst. Hierzu wurden Zellen der Linien SW 620, HT-29, T84 und Geki-2 mit *E. coli* Nissle beimpft und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrollzellen wurden in Bakterien-freiem Medium für 4 Stunden inkubiert. Nach Isolierung der zellulären RNA wurde die *camp*-Expression mittels Real-time PCR quantitativ bestimmt (Abb. 10). Die Signifikanz wurde auf eine 10-fache Erhöhung der *camp*-Expression festgelegt.



**Abb. 10** Quantitative Real-Time PCR Analyse der *camp*-Expression in Kolonepithelzellen nach Infektion mit *E. coli* Nissle

SW 620, HT-29, T84 und Geki-2 wurden mit *E. coli* Nissle beimpft und für 4h bei 37°C in Anwesenheit von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend wurden Real-Time Analysen durchgeführt. Die *camp*-Expression ist als „-fache Expression“ relativ zur Mediumkontrolle dargestellt. Die *camp*-Expression wurde durch die Inkubation mit *E. coli* Nissle in der Adenomzelllinie Geki-2 signifikant gesteigert (Es wurde festgelegt, dass die relative Expression signifikant ist, sobald sie mind. 10-fach ist.). Die Ergebnisse wurden für die statistische Relevanz mit dem students t-test analysiert. Die Werte sind Mittelwerte ± SD; n=9 (Geki-2; SW 620; T84); n=12 (HT-29).

Eine Inkubation mit *E. coli* Nissle beeinflusst die *camp*-Expression in den Zelllinien SW 620 und HT-29 nicht. In der Kolonkarzinomlinie T84 wird die Expression auf das 7-fache induziert; in der Adenomzelllinie Geki-2 steigt die LL-37-Genexpression sogar auf das 23,1-fache.

In einem zusätzlichen Infektionsassay wurde untersucht, ob nach Stimulation der Kolonepithelzellen mit Butyrat eine Infektion mit *E. coli* Nissle zu einer weiteren *camp*-Induktion führt. Hierfür wurden die Kolonepithelzellen vor der Beimpfung mit Bakterien für 48 Stunden mit Butyrat (4mM) inkubiert. Die zelluläre RNA wurde isoliert und die *camp*-Expression mittels Real-Time PCR ermittelt. Es zeigte sich, dass eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit Butyrat die *camp*-Expression nach Inkubation mit *E. coli* Nissle nicht beeinflusst.

## 4 Diskussion

Die Oberflächenepithelien eines Organismus sind ein wichtiger Bestandteil seines angeborenen Immunsystems. Sie schützen den Organismus vor Infektionen durch pathogene Mikroorganismen, indem sie sowohl eine physikalische, als auch eine chemische Barriere bilden. Diese chemische Barriere besteht beispielsweise aus verschiedenen antimikrobiellen Peptiden (AMPs), die von den Epithelzellen produziert werden und Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems darstellen.

Mehr als 30 verschiedene AMPs sind bekannt, die im menschlichen Körper zu finden sind (Nijnik und Hancock 2009). Diese lassen sich in drei Familien unterteilen: die Defensine, die Cathelicidine und die Histatine (Bals, 2000). Das einzige bekannte humane Cathelicidin ist das hCAP18/LL-37.

Es wurde bereits gezeigt, dass menschliche Kolonepithelzellen das AMP LL-37/hCAP18 exprimieren. Dieses wird in das Darmsekret sezerniert und dort nach Spaltung durch die Serinprotease 3 in seine aktive Form überführt (Sorensen *et al.* 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von synthetischem LL-37 auf das Wachstum von *E. coli* Nissle *in vitro* untersucht. Außerdem wurden die antimikrobielle Aktivität und die *camp*-Expression verschiedener Kolonepithelzelllinien nach Koinkubation mit Butyrat und *E. coli* Nissle analysiert, um herauszufinden, ob *E. coli* Nissle als Probiotikum die LL-37-Expression unterstützt.

### 4.1 Antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle

Es konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 *in vitro* abhängig von der Konzentration des antimikrobiellen Peptids ist. Je

höher die Konzentration von LL-37 war, desto weniger Bakterien überlebten (Abb.4). Die "minimal inhibitory concentration" (MIC) für synthetisches LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle wurde auf 0,25 µM bestimmt. Als "minimal bactericidal concentration" (MBC) wurde eine Konzentration von 8 µM ermittelt. Die LD<sub>50</sub> (Dosis, bei der 50% der Bakterien abgetötet werden), wurde auf ungefähr 2,2 µM bestimmt.

Vergleicht man diese Werte mit den Ergebnissen anderer Studien, so wird deutlich, dass für die Wachstumshemmung und Abtötung von *E. coli* Nissle eine relativ hohe Konzentration des antimikrobiellen Peptids LL-37 notwendig ist. Zum Beispiel bestimmten Hase *et al.* gegenüber *H. pylori* eine LD<sub>50</sub> von 1,4 µM (Hase *et al.* 2003). In einer anderen Versuchsreihe ermittelten Bergmann *et al.* eine MIC von 0,2 µM für LL-37 gegenüber *N. gonorrhoeae*. Die MBC lag hier bei 0,8 µM (Bergmann *et al.* 2005). *H. pylori* und *N. gonorrhoeae* sind jedoch im Gegensatz zu *E. coli* Nissle humanpathogene Mikroorganismen. *H. pylori* ist Auslöser der chronisch-aktiven Gastritis vom Typ B und ist ebenso an der Entstehung des Ulcus ventriculi und des Ulcus duodeni beteiligt. *N. gonorrhoeae* ist Erreger der sexuell übertragbaren Erkrankung Gonorrhoe (Tripper). Das Bakterium *E. coli* Nissle hingegen ist ein Probiotikum und Teil der physiologischen Darmflora. Es ist also folgerichtig, dass für die Wachstumshemmung und Abtötung von *H. pylori* und *N. gonorrhoeae*, die ja schädlich für den Organismus sind, eine niedrigere Konzentration des antimikrobiellen Peptids LL-37 ausreichend ist als für die Wachstumshemmung von *E. coli* Nissle, welches dem Wirt als Probiotikum einen gesundheitlichen Nutzen bringt.

Jedoch muss immer berücksichtigt werden, dass diese Daten aus *in vitro* Versuchen erhoben wurden, die den physiologischen Bedingungen des menschlichen Körpers nicht ganz entsprechen. So hat LL-37 bei physiologisch relevanten Salz- und Peptidkonzentrationen keine direkte antimikrobielle Aktivität (Bowdish *et al.* 2005). Auf Schleimhautoberflächen beträgt die Konzentration von LL-37 weniger als 2 µg/ml (Lai *et al.* 2009).

Erheblich beeinflusst wird die antimikrobielle Aktivität von LL-37 von den Umgebungsbedingungen, beispielsweise von der Salzkonzentration. Im

Versuchsansatz mit 25 mM Natriumbicarbonat konnte im Vergleich zum Versuchsansatz ohne Natriumbicarbonat eine deutliche Steigerung der antimikrobiellen Aktivität von LL-37 gegenüber *E. coli* Nissle festgestellt werden. Diese Aktivitätssteigerung lässt sich auf die Induktion der  $\alpha$ -Helix-Struktur des Peptids im Salzmedium zurückführen (Agerberth *et al.* 1995). Die Entstehung der  $\alpha$ -Helix-Struktur des LL-37 ist abhängig von den anwesenden Anionen, dem pH-Wert und der Konzentration des Peptids. Der in der  $\alpha$ -Helix-Struktur vorliegende Anteil des LL-37 korreliert gut mit dessen antimikrobieller Aktivität (Johansson *et al.* 1998).

Anders verhält es sich bei dem AMP hBD-1, welches nur in seiner reduzierten, nicht gefalteten Form wirksam ist. hBD-1 besitzt 3 intramolekulare Disulfidbrücken. Erst nach Reduktion der Disulfidbrücken entwickelt es eine starke antimikrobielle Wirksamkeit, zum Beispiel gegen *Candida albicans* (Schroeder *et al.* 2011).

#### **4.2 Antimikrobielle Aktivität von Kolonepithelzellen gegenüber *E. coli* Nissle mit und ohne Stimulation durch Butyrat**

*E. coli* Nissle ist ein probiotisches Bakterium, das zur physiologischen Darmflora des Menschen gehört. Allerdings sind nicht alle Mikroorganismen, die den Magen-Darm-Trakt besiedeln, nur nützlich. Einige haben neben ihren gesundheitsfördernden Eigenschaften auch pathogenetische Eigenschaften. Es ist also eine interessante Frage, wie es den Kolonepithelzellen gelingt, sich vor solchen Infektionen zu schützen. Die normale Konzentration von *E. coli* in der Darmflora beträgt ungefähr  $2 \cdot 10^7$ - $6 \cdot 10^7$ /ml ([www.intestinal.de](http://www.intestinal.de)). In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene Kolonepithelzelllinien mit ungefähr  $5 \cdot 10^7$ /ml *E. coli* Nissle beimpft. Dies entspricht somit der Anzahl an *E. coli*, die in der gesunden Kolonschleimhaut vorkommen.

Für die Infektionsassays wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet, die aus Adenokarzinomen des Kolons stammen (SW 620, HT-29 und T84) und die Adenomzelllinie Geki-2. Die Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und T84 zeigten



keinen signifikanten Einfluss auf das Bakterienwachstum, während die Kolonkarzinomzelllinie SW 620 das Bakterienwachstum auf unter 15% reduzierte. Die Adenomzelllinie Geki-2 reduzierte das Bakterienwachstum auf ca. 40%. Dies ist interessant, da Geki-2 die einzige verwendete Adenomzelllinie ist und somit weit mehr differenziert ist als die übrigen drei Karzinomzelllinien. Der Differenzierungsstatus der Zellen ist eine relevante Determinante für die Genexpression und hiermit wichtig für die antimikrobielle Aktivität, da in höher differenzierten Zellen durch eine Steigerung der *camp*-Expression mehr antimikrobiell wirksames LL-37 gebildet werden kann.

Obwohl bekannt ist, dass die Inkubation mit Butyrat die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen zeit- und dosisabhängig steigert (Schauber *et al.* 2003), zeigte eine zusätzliche Stimulation mit Butyrat in unseren Versuchsreihen keine Steigerung der antimikrobiellen Aktivität der Zelllinien gegenüber *E. coli* Nissle im Vergleich mit den Medium-behandelten Kontrollzellen. Für dieses Ergebnis gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: Es könnte sein, dass die Behandlung mit Butyrat nicht zu einer gesteigerten Synthese von hCAP18 geführt hat, obwohl eine Transkription von *camp* in mRNA stattgefunden hat. Ebenso ist es denkbar, dass hCAP18 zwar von den Kolonepithelzellen produziert, aber nicht sezerniert wurde oder aber dass hCAP18 zwar sezerniert, aber nicht extrazellulär gespalten und somit nicht aktiviert wurde. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, müsste man die Proteinmengen bestimmen, zum Beispiel mittels Western Blot oder Immunhistochemie.

Weiterhin wäre es möglich, dass hCAP18 sowohl korrekt sezerniert, als auch durch Spaltung in die aktive Form LL-37 überführt wird, dass aber die Menge des sezernierten Proteins nicht ausreicht, um eine antimikrobielle Aktivität zu entwickeln. Um dies auszuschließen, könnte man den Versuch mit einer verlängerten Inkubationszeit durchführen, womit eventuell eine höhere LL-37-Konzentration erreicht werden könnte.

### 4.3 *camp*-Expression in Kolonepithelzellen nach Inkubation mit *E. coli* Nissle

Die Expression von *camp* wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. So wird sie zum Beispiel durch pro-inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Bestandteile von Bakterien (Bucki *et al.* 2010), kurzkettige Fettsäuren (Schauber *et al.* 2003), Vitamin D3 (Wang *et al.* 2004; Gombart *et al.* 2005) und HIF1 $\alpha$  (Peyssonnaud *et al.* 2008) gesteigert.

Außerdem hat man festgestellt, dass verschiedene Bakterien die Produktion von LL-37 auf unterschiedliche Weise beeinflussen. *H. pylori* zum Beispiel reguliert die LL-37/hCAP18-Produktion in Epithelzellen der Magenschleimhaut hoch (Hase *et al.* 2003), während *Shigella* die LL-37-Expression im Rahmen von Darminfektionen reduziert (Islam *et al.* 2001). *N. gonorrhoeae* reguliert die Expression von LL-37 im Zervikalepithel herunter, auch in Anwesenheit von Butyrat (Bergman *et al.* 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die *camp*-Expression in den verschiedenen Kolonepithelzelllinien nach Inkubation mit *E. coli* Nissle untersucht. Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit *E. coli* Nissle die *camp*-Expression in den Zelllinien SW 620 und HT-29 nicht beeinflusst. In der Kolonkarzinomzelllinie T84 wird die Expression auf das 7-fache induziert; in der Adenomzelllinie Geki-2 steigt die LL-37-Genexpression sogar auf das 23,1-fache.

Eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit Butyrat resultierte nicht in einer weiteren *camp*-Expression.

Wie bereits in Studien an Epithelzellkulturen festgestellt werden konnte, kann *E. coli* Nissle ebenfalls ein humanes Beta-Defensin (hBD-2) zeit- und dosisabhängig hoch regulieren (Wehkamp *et al.* 2004). hBD-2 zeigt wie LL-37 antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum an Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sowie gegen Pilze und Viren. Dies ist besonders interessant, da es sich bei dem Bakterium *E. coli* Nissle um ein Probiotikum handelt. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass intestinale Epithelzellen mit Hilfe von *E. coli* Nissle 1917 in der Lage sind, die Anheftung und das Eindringen verschiedener pathogener Bakterien zu verhindern (Altenhoefer *et al.*

2004). Außerdem wird *E. coli* Nissle therapeutisch genutzt zur Remissionserhaltung bei Colitis ulcerosa (Schultz, 2008; Kruis *et al.* 1997 und 2004; Rembacken *et al.* 1999). Der probiotische Effekt des Bakteriums könnte also dadurch erklärt werden, dass die antimikrobielle Funktion der Darmschleimhaut durch eine Induktion der *camp*- und der hBD-2-Expression verbessert wird.

#### 4.4 Gesamtbeurteilung der Koinkubationsversuche

Insgesamt kann man also aus diesen Ergebnissen schließen, dass die antimikrobielle Aktivität der Zelllinie SW 620 gegenüber *E. coli* Nissle unabhängig von der LL-37-Expression ist und auf eine andere Eigenschaft dieser Zelllinie zurückzuführen sein muss.

Eine Inkubation der Adenomzelllinie Geki-2 mit *E. coli* Nissle führte dagegen zu einer hochsignifikanten Induktion der *camp*-Expression in diesen Zellen. Es liegt also nahe, dass die antimikrobielle Aktivität der Zellen dieser Linie gegenüber *E. coli* Nissle zumindest teilweise aus einer erhöhten LL-37-Expression resultiert. Dies kann damit begründet werden, dass die Adenomzelllinie Geki-2 weit mehr differenziert ist als die übrigen drei Karzinomzelllinien und der Differenzierungsstatus der Zellen eine relevante Determinante für die Genexpression ist und somit bedeutend zur antimikrobiellen Aktivität der Zellen beiträgt.

*E. coli* Nissle kann somit als Probiotikum den Darm bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen unterstützen, indem es neben einer vermehrten hBD-2-Expression auch eine vermehrte Bildung von LL-37 in den Kolonepithelzellen induziert. Zwar kann LL-37 wiederum das Wachstum von *E. coli* Nissle hemmen, jedoch sind hierfür höhere Konzentrationen des AMPs nötig als für die Abtötung einiger Pathogene. Man kann also davon ausgehen, dass insgesamt durch *E. coli* Nissle die Darmbarriere effektiv unterstützt wird.

#### 4.5 Mögliche Einsatzgebiete von LL-37 in der Zukunft

Durch den beträchtlichen Gebrauch von Antibiotika in der Klinik kommt es zu einem dramatischen Anstieg der Resistenzen von verschiedenen Mikroorganismen. Daher ist die Entwicklung von neuen antibiotisch wirksamen Medikamenten eine der wichtigsten Aufgaben der Biomedizin und der Pharmaindustrie geworden. Antimikrobielle Peptide und ihre synthetischen Derivate könnten in Zukunft eine Alternative zu den üblichen Antibiotika darstellen (Nell *et al.* 2006).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass LL-37 die Replikation von HIV-1 in mononukleären Zellen des peripheren Bluts, einschließlich CD4+ T-Zellen, hemmt. LL-37 könnte also auch an der lokalen Abwehr der HIV-1 Infektion beteiligt sein (Bergman *et al.* 2007) und möglicherweise bei deren Behandlung eingesetzt werden.

In einem Modellversuch mit Ratten wurde das Peritoneum mit menschlichem Stuhl kontaminiert und infiziert, um die klinischen Bedingungen einer Peritonitis beim Menschen zu simulieren. Hier verbesserte eine Therapie mit LL-37 die Überlebenschancen deutlich (Torossian *et al.* 2007). Das Peptid könnte also in Zukunft ein wichtiger Bestandteil der Behandlung des septischen Schocks werden.

Eine weitere Eigenschaft des antimikrobiellen Peptids LL-37, die man therapeutisch nutzen könnte, ist die Unterstützung der Wundheilung. LL-37 führt zu einer signifikanten Verbesserung der Reepithelialisierung und der Bildung von Granulationsgewebe (Carretero *et al.* 2008).

## 5 Zusammenfassung

Antimikrobielle Peptide und Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunabwehr. Sie sind auf verschiedenen Schleimhautoberflächen des Körpers zu finden, zum Beispiel auch in der Schleimschicht des Gastrointestinaltraktes. So entsteht neben der mechanischen auch eine chemische Barriere zwischen dem Organismus und der Außenwelt und das Eindringen pathogener Mikroorganismen wird verhindert.

Beim Menschen sind drei Familien antimikrobiell wirksamer Peptide bekannt: die Defensine, die Cathelicidine und die Histatine. LL-37 ist das einzige Cathelicidin, das bisher beim Menschen gefunden wurde.

LL-37 zeigt allein und zusammen mit anderen antimikrobiellen Proteinen bakterizide Wirkung auf ein breites Spektrum an Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie auf verschiedene Viren und Pilze.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von synthetischem LL-37 auf das Wachstum des probiotischen Bakteriums *E. coli* Nissle *in vitro* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass LL-37 das Wachstum von *E. coli* Nissle konzentrationsabhängig hemmt und dass sich die antimikrobielle Aktivität durch Zugabe von Natriumbicarbonat steigern lässt.

Ferner wurde die antimikrobielle Aktivität verschiedener Kolonepithelzelllinien gegenüber *E. coli* Nissle getestet. Zusätzlich wurde die LL-37-Genexpression in den jeweiligen Zelllinien nach Koinkubation mit *E. coli* Nissle +/- Butyratzugabe untersucht. So konnte die LL-37-Genexpression mit der antimikrobiellen Aktivität der Zelllinien in Beziehung gesetzt werden.

Von den vier untersuchten Zelllinien zeigten die Kolonkarzinomzelllinie SW 620 und die Adenomzelllinie Geki-2 eine signifikante antimikrobielle Aktivität gegenüber *E. coli* Nissle. Die LL-37-Genexpression wurde durch die Kolonkarzinomzelllinie T84 auf das 7-fache gesteigert, in der Adenomzelllinie Geki-2 sogar auf das 23,1-fache. Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass die antimikrobielle Aktivität der Zelllinie SW 620 gegenüber *E. coli* Nissle

unabhängig von der LL-37-Expression ist und auf eine andere Eigenschaft dieser Zelllinie zurückzuführen sein muss. Interessanterweise zeigt die Adenomzelllinie Geki-2, die weit mehr differenziert ist als die übrigen hier untersuchten Zelllinien, eine hochsignifikante Steigerung der *camp*-Expression. Die antimikrobielle Aktivität der Geki-2 Zellen gegenüber *E. coli* Nissle resultiert also zumindest teilweise aus einer erhöhten LL-37-Expression.

Die probiotische Wirksamkeit des Bakteriums *E. coli* Nissle könnte somit unter anderem durch eine Verbesserung der antimikrobiellen Funktion der Darmschleimhaut infolge einer Induktion der *camp*-Expression in differenzierten Kolonepithelzellen erklärt werden. So werden Probiotika beispielsweise bereits zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt.

## Literaturverzeichnis

- Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jornvall H., Wigzell H., Gudmundsson G.H.** 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96, 3086-3093.
- Agerberth B., Gunne H., Oderberg J., Kogner P., Boman H.G., Gudmundsson G.H.** 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 195-199.
- Altenhoefer A., Oswald S., Sonnenborn U., Enders C., Schulze J., Hacker J., Oelschlaeger T.A.** 2004. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*; 40, 223-229.
- Bals R.** 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, 1(3), S.141-150.
- Bals R., Wang X., Zasloff M., Wilson J.M.** 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 9541-9546.
- Bals R., Weiner D.J., Moscioni A.D., Meegalla R.L., Wilson J.M.** 1999. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun*, 67(11), 6084-9.
- Bergman P., Johansson L., Asp V., Plant L., Gudmundsson G.H., Jonsson A.B., Agerberth B.** 2005. *Neisseria gonorrhoeae* downregulates expression of the human antimicrobial peptide LL-37. *Cell Microbiol*, 7(7), 1009-17.
- Bergmann P., Walter-Jallow L., Broliden K. et al.** 2007. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr HIV Res* 5, 410-415.

- Bevins C.L., Martin-Porter E., Ganz T.** 1999. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*, 45(6), 911-5.
- Bowdish D.M., Davidson D.J., Lau Y.E., Lee K., Scott M.G., Hancock R.E.** 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol*, 77(4), 451-459.
- Brandenburg LO, Varoga D., Nicolaeva N. et al.** 2008. Role of glial cells in the functional expression of LL-37/rat cathelin-related antimicrobial peptide in meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 1041-1054.
- Carretero M., Escamez MJ, Garcia M. et al.** 2008. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. *J Invest Dermatol* 128, 223-236.
- Conner K., Nern K., Rudisill J., O'Grady T., Gallo R.L.** 2002. The antimicrobial peptide LL-37 is expressed by keratinocytes in condyloma accuminatum and verruca vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47, 347-350.
- Cowland J.B., Johnsen A.H., Borregaard N.** 1995. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* 368, 173-176.
- Di Nardo A., Vitiello A., Gallo R.L.** 2003. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J. Immunol.*, 170, 2274-2278.
- Dorschner R.A., Pestonjamas V.K., Tamakuwala S., Ohtake T., Rudisill J., Nizet V., Agerberth B., Gudmundsson G.H., Gallo R.L.** 2001. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *J. Invest. Dermatol.* 117, 91-97.
- Frohm M., Agerberth B., Ahangari G., Stahle-Bäckdahl M., Liden S., Wigzell H., Gudmundsson G.H.** 1997. The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders. *Journal of Biological Chemistry* 272(24), S. 15258-15263.



- Frohm M., Sandstedt B., Sorensen O., Weber G., Borregaard N., Stahle-Backdahl M.** 1999. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect. Immun.* 67, 2561-2566.
- Fukumoto K., Nagaoka I., Yamataka A., Kobayashi H., Yanai T., Kato Y., Miyano T.** 2005. Effect of antibacterial cathelicidin peptide CAP18/LL-37 on sepsis in neonatal rats. *Pediatr. Surg. Int.* 21, 20-24.
- Gallo R.L. Leung D.Y.** 2002. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1151-1160.
- Golec M.** 2007. Cathelicidin LL-37:LPS-neutralizing, pleiotropic peptide. *Ann Agric Environ Med* 2007, 14, 1-4.
- Gombart A.F., Borregaard N., Koeffler H.P.** 2005. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J.* 19, 1067-1077.
- Gough M., Hancock R.E.W., Kelly N.M.** 1996. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun*, 64, 4922-4927.
- Gudmundsson G.H., Agerberth B.** 1999. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J. Immunol Methods*, 232(1-2), 45-54.
- Gudmundsson G.H., Agerberth B., Odeberg J. et al.** 1996. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*, 238, 325-32.
- Gudmundsson G.H., Agerberth B., Odeberg J., Bergman T., Olsson B., 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(2), S. 325-32.
- Gustafsson B.E.** 1982. The physiological importance of the colonic microflora. *Scand J Gastroenterol Suppl*; 77, 117-31.
- Gutsmann T., Fix M., Larrick J.W., Wiese A.** 2000. Mechanisms of action of rabbit CAP18 on monolayers and liposomes made from endotoxins or phospholipids. *J Membr Biol*, 176(3), S. 223-36.

- Gutsmann T., Larrick J.W., Seydel U., Wiese A.** 1999. Molecular mechanisms of interaction of rabbit CAP18 with outer membranes of gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 38(41), S. 13643-53.
- Hammami-Hamza S., Doussau M., Bernard J., Rogier E., Duquenne C., Richard Y., Lefevre A., Finaz C.** 2001. Cloning and sequencing of SOB3, a human gene coding for a sperm protein homologous to an antimicrobial protein and potentially involved in zona pellucida binding. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 625-632.
- Harder J., Bartels J., Christophers E. et al.** 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387 (6636): 861.
- Hase K., Eckmann L., Leopard J.D., Varki N., Kagnoff M.F.** 2002. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect. Immun.* 70, 953-963.
- Hase K., Murakami M., Imura M., Cole S.P., Horibe Y., Ohtake T., Obonyo M., Gallo R.L., Eckmann L., Kagnoff M.F.** 2003. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 125(6), 1613-25.
- Hill M.J., Drasar B.S.** 1975. The normal colonic bacterial flora. *Gut* 16(4), 318-23.
- Islam D., Bandholtz L., Nilsson J., Wigzell H., Christensson B., Agerberth B., Gudmundsson G.** 2001. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator.
- Johansson J., Gudmundsson G.H., Rottenberg M.E., et al.** 1998. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem*, 273, 3718-24.
- Jung H.H., Chae S.W., Jung S.K., Kim S.T., Lee H.M., Hwang S.J.** 2003. Expression of a cathelicidin antimicrobial peptide is augmented in cholesteatoma. *Laryngoscope* 113, 432-435.

- Kim S.T., Cha H.E., Kim D.Y., Han G.C., Chung Y.S., Lee Y.J., Hwang Y.J., Lee H.M.** 2003. Antimicrobial peptide LL-37 is upregulated in chronic nasal inflammatory disease. *Acta Otolaryngol.* 23, 81-85.
- Koczulla R., Von Degenfeld G., Kupatt C., Krotz F., Zahler S., Gloe T., Issbrucker K., Unterberger P., Zaiou M., Lebherz C., et al.** 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111, 1665-1672
- Koczulla R., Von Degenfeld G., Kupatt C., Krotz F., Zahler S., Gloe T., Issbrucker K., Unterberger P., Zaiou M., Lebherz C., Karl A., Raake P., Pfosser A., Boekstegers P., Welsch U., Hiemstra P.S., Vogelmeier C., Gallo R.L., Clauss M., Bals R.** 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111, 1665-1672.
- Kruis W., Schutz E., Fric P., Fixa B., Judmaier G., Stolte M.** 1997. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 11(5), 853–858.
- Kruis W., Fric P., Pokrotnieks J., Lukas M., Fixa B., Kascak M., Kamm M.A., Weismueller J., Beglinger C., Stolte M., Wolff C., Schulze J.** 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*; 53, 1617-1623.
- Kumar A., Yin J., Zhang J. et al.** 2007. Modulation of corneal epithelial innate immune response to pseudomonas infection by flagellin pretreatment. *Invest Ophthalmol. Vis Sci* 48, 4664-4670.
- Lai Y., Gallo R.L.** 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30, 131-141.
- Larrick J.W., Hirata M., Balint R.F., Lee J., Zhong J., Wright S.C.** 1995. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 63, 1291-1297.

- Malm J., Sorensen O., Persson T., Frohm-Nilsson M., Johansson B., Bjartell A., Lilja H., Stahle-Backdahl M., Borregaard N., Egesten A.** 2000. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect. Immun.* 68, 4297-4302.
- Menzel T., Melcher R., Koehler S., Dusel G., Backhaus K., Ott G., Breithaupt W., Al-Taie O., Schauber J., Gostner A., Scheppach W., Luhrs H.** 2004. Establishment of a colonic adenoma cell line (GEKI-2): spectral karyotype analysis and functional characterization. *Int J Colorectal Dis*, 19(1), 12-7.
- Murakami M., Ohtake T., Dorschner R.A., Gallo R.L.** 2002b. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J. Dent. Res.* 81, 845-850.
- Murakami M., Ohtake T., Dorschner R.A., Schitteck, B., Garbe C., Gallo R.L.** 2002a. Cathelicidin antimicrobial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J. Invest. Dermatol.* 119, 1090-1095.
- Nell M.J., Tjabringa G.S., Wafelman A.R., Verrijck R., Hiemstra P.S., Drijfhout J.W., Grote J.J.** 2006. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides*, 27, 649-660.
- Nijnik A., Hancock R.E.** 2009. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol.* 16, 41-47.
- Niße A.** 1917. Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien. *Medizinische Klinik*, 1918 (2) S. 29-33.
- Nizet V., Ohtake T. Lauth X., Trowbridge J., Rudisill J., Dorschner R.A., Pestonjamasp V., Piraino J., Huttner K., Gallo R.L.** 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*, 414(6862), 454-7.

- Ong P.Y., Ohtake T., Brandt C., Strickland I., Boguniewicz M., Ganz T., Paulsen F., Pufe T., Conradi L., Varoga D., Tsokos M., Papendieck J., Petersen W.** 2003. Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. *J. Pathol.* 198, 369-377.
- Peach S., Fernandez F., Johnson K., Drasar B.S.** 1974. The non-sporing anaerobic bacteria in human faeces. *J. med. Microbiol.*, 7, 213-221.
- Petrof E.O.** 2009. Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 8(3), 260-269.
- Peyssonnaud C., Boutin AT, Zinkernagel AS et al.** 2008. Critical role of HIF-1 alpha in keratinocyte defense against bacterial infection. *J Invest Dermatol* 128, 1964-1968.
- Putsep K., Carlsson G., Boman H.G., Andersson M.** 2002. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet* 360, 1144-1149.
- Ramasundara M., Leach ST, Lemberg DA, Day AS.** 2009. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 24(2), 202-208.
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT.** 1999. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet.* 354(9179), 635–639.
- Schaller-Bals S., Schulze A., Bals R.** 2002. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 992-995.
- Schauber J., Svanholm C., Termén S., Iffland K., Menzel T., Scheppach W., Melcher R., Aberberth B., Lühns H., Gudmundsson G.H.** 2003. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut*; 52, 735-741.

- Schlee M., Wehkamp J., Altenhoefer A., Oelschlaeger T.A., Stange E.F., Fellermann K.** 2007. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun.* 75(5), 2399–2407.
- Schroeder B.O., Zhihong Wu., Nuding S., Groscurth S., Marcinowski M., Beisner J., Buchner J., Schaller M., Stange E.F., Wehkamp J.** 2011. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human  $\beta$ -defensin 1. *Nature.* 469, 419-423.
- Schultz M.** 2008. Clinical use of E. coli Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 14(7), 1012-1018.
- Scott M.G., Davidson D.J., Gold M.R., Bowdish D., Hancock R.E.** 2002. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses . *J. Immunol.* 169, 3883-3891.
- Shaykhiev R., Beisswenger C., Kandler K., Senske J., Puchner A., Damm T., Behr J., Bals R.** 2005. Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,* 289, 842-848.
- Smeianov V., Scott K., Reid G.** 2000. Activity of cecropin P1 und FA-LL-37 against urogenital microflora. *Microbes Infect* 2, 773-777.
- Sorensen O., Arnljots K., Cowland J.B., Bainton D.F., Borregaard N.** 1997. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood,* 90, 2796-2803.
- Sorensen O.E., Follin P., Johnsen A.H., Calafat J., Tjabringa G.S., Hiemstra P.S., Borregaard N.** 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood,* 97(12), S. 3951-3959.
- Torossian A., Gurschi E., Bals R. *Et al.*** 2007. Effects of the antimicrobial peptide LL-37 and hyperthermic preconditioning in septic rats. *Anesthesiology* 107, 437-441.
- Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR *et al.*** 2000. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun* 68, 2748-2755.

- Turner J., Cho Y., Dinh N.N., Waring A.J., Lehrer R.I.** 1998. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(9), S. 2206-14.
- Wang T.T., Nestel F.P., Bourdeau V., Nagai Y., Wang Q., Liao J., Tavera-Mendoza L., Lin R., Hanrahan J.W., Mader S., White J.H.** 2004. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.*, 173, 2909-2912.
- Wehkamp J., Harder J., Wehkamp K., Wehkamp-von Meissner B., Schlee M., Enders C., Sonnenborn U., Nuding S., Bengmark S., Fellermann K., Schroder JM, Stange EF.** 2004. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun.* 72(10), 5750–5758.
- Welling M.M., Hiemstra P.S., van den Barselaar M.T., Paulusma-Annema A., Nibbering P.H., Pauwels E.K., Calame W.** 1998. Antibacterial activity of human neutrophil defensins in experimental infections in mice is accompanied by increased leukocyte accumulation. *J. Clin. Invest.* 102, 1583-1590.
- Yang, Y.H., Zheng G.G., Li G., Zhang B., Song Y.H., Wu K.F.** 2003. Expression of LL-37/hCAP-18 gene in human leukaemia cells. *Leuk. Res.* 27, 947-950.
- Yoshio H., Tollin M., Gudmundsson G., Lagercrantz H., Jörnvall H., Marchini G.** 2003. Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defence. *Pediatr Res*, 53, 211-216.
- Zanetti M.** 2005. The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals. *Curr Issues Mol Biol*, 7(2), S.179-196.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schemazeichnung der cDNA des kompletten Präpro-LL-37 .....	3
Abb. 2: Grafisches Modell der Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden .....	6
Abb. 3: Prinzip der Real-time PCR.....	21
Abb. 4: Antimikrobielle Aktivität von synthetischem LL-37 gegenüber <i>E. coli</i> Nissle....	24
Abb. 5: LD <sub>50</sub> von LL-37 gegenüber <i>E. coli</i> Nissle .....	25
Abb. 6: Antimikrobielle Aktivität von LL-37 gegenüber <i>E. coli</i> Nissle in 25 mM Natriumbikarbonat.....	26
Abb. 7: LD <sub>50</sub> von LL-37 gegenüber <i>E. coli</i> Nissle in 25 mM Natriumbicarbonat.....	27
Abb. 8: Antimikrobielle Aktivität von Kolonepithelzellen gegenüber <i>E. coli</i> Nissle ohne Butyrat .....	28
Abb. 9: Antimikrobielle Aktivität von Kolonepithelzellen gegenüber <i>E. coli</i> Nissle mit Butyrat.....	29
Abb. 10: Quantitative Real-Time PCR Analyse der <i>camp</i> -Expression 31 Kolonepithelzellen nach Infektion mit <i>E. coli</i> Nissle .....	31



## Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielles Peptid
BMAPs	bovine myeloid antimicrobial peptides
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptid
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony-forming unit
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRAMP	cathelin-related antimicrobial peptide
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco Modified Eageł's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonuclein acid / Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
E. coli	Escherichia coli
FBS	fetal bovine serum, bovines Serumalbumin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
g	Gramm
h	hour/Stunde
H. pylori	Helicobacter pylori
HIV	human immunodeficiency virus
hBD2	humanes beta-Defensin 2
hCAP18	human cationic antimikrobielles peptid (mit 18 kDa)
HIF1 $\alpha$	Hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha
IL	Interleukin
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LD	letale Dosis
LL-37	antimikrobielles Peptid (37 Aminosäurereste)
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
MAP	mitogen-activated protein

MBC	minimale bakterizide Konzentration
MEK	mitogen/extracellular signal protein kinase
MEM	Minimum Essential Medium
μ	Mikro
mM/μM	Millimolar/Mikromolar
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
mRNA	messenger RNA
MRSA	methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbicarbonat/Natriumhydrogencarbonat
NEAA	nonessential amino acids
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
N. gonorrhoeae	Neisseria gonorrhoeae
OD	optische Dichte
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	phosphat buffered saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonuclein acid/Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SD	Standardabweichung
t	Signifikanz
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
WHO	world health organisation

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Scheppach, dem Leiter des Projekts, für die Überlassung des Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Dorothee Rogoll für die hervorragende Betreuung, ihre Hilfsbereitschaft und für ihre Mühe beim Korrekturlesen der Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des gastroenterologischen Forschungslabors für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Unterstützung.

Meinem Bruder, Maximilian Schwab, danke ich für seine geduldige Unterstützung durch seine fundierten EDV-Kenntnisse.