

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr.med. H. Einsele

**Modulation der Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in humanen
Kolonepithelzellen und Monozyten durch PPAR-Liganden**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Dominic Schröder
aus Geldern

Würzburg, Dezember 2005

Referent: Professor Dr. med. W. Scheppach

Korreferent: Professor Dr.med. D. Meyer

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2006

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

<i>1.1 Antimikrobielle Peptide</i>	1
<i>1.2 Peroxisome proliferator-activated receptor</i>	4
<i>1.3 Ziel der vorliegenden Untersuchungen</i>	9

2 Material und Methoden

<i>2.1 Zellen und Zellkulturexperimente</i>	10
<i>2.2 RNA Extraktion</i>	10
<i>2.3 RNA Aufreinigung und RNase-free DNase Behandlung</i>	11
<i>2.4 cDNA-Synthese</i>	12
<i>2.5 Real-Time RT-PCR</i>	12
<i>2.6 Messung der Gesamtproteinkonzentration</i>	14
<i>2.7 Kernisolierung</i>	14
<i>2.8 PPARγTranscription Factor assay</i>	16
<i>2.9 Western Blot</i>	16
<i>2.10 FACS- Analyse</i>	19
<i>2.11 Differenzierungsuntersuchung</i>	20

3 Ergebnisse

<i>3.1 Nachweis von PPARγ1 und 2 in Kolonepithelzelllinien</i>	22
<i>3.2 Wirkung von PPAR- und RXR- Liganden auf die LL-37 Expression</i>	24
<i>3.3 Wirkung von PPARγLiganden auf die LL-37 Expression im Verhältnis zur PPARγ Aktivität im Zellkern</i>	35

4	Diskussion	39
5	Zusammenfassung	46
6	Verwendete Abkürzungen	48
7	Literaturverzeichnis	49

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Antimikrobielle Peptide

In den letzten Jahren sind aus den unterschiedlichsten Organismen Peptide isoliert worden, die in der Lage sind, pathogene Keime sehr effektiv abzutöten [1, 2]. Diese Peptide, deren Wirkungsspektrum viele Bakterien, Viren und sogar Pilze umfasst, wurden zu der Gruppe der antimikrobiellen Peptide (AMP) zusammengefasst [3, 4]. Obwohl es sich dabei um eine sehr heterogene Gruppe von Peptiden handelt, weisen sie doch einige strukturelle Ähnlichkeiten auf, die für ihre Funktion essentiell sind. Mit einer Anzahl von weniger als 100 Aminosäuren sind es kleine Proteine, die alle in einem Milieu mit neutralem pH-Wert eine positive Nettoladung besitzen [5]. Diese Eigenschaft ermöglicht es, dass die AMP mit ihrer positiven Ladung an negativ geladene Bestandteile von Biomembranen binden und sich in diese einlagern können [6]. Zwischen mehreren auf diese Art in die Membran eingebauten Peptiden bildet sich ein Kanal, der für Ionen durchgängig ist [7]. Dies bewirkt, dass das Membranpotential zusammenbricht und der Mikroorganismus abstirbt. Es sind weiterhin auch noch andere Wirkungsweisen von AMP bekannt, die durch spezifische Interaktionen der AMP mit Rezeptoren und intrazellulären Proteinen zustande kommen [8, 9]. Aufgrund der mikrobiziden Wirkung kommt es selten zur Resistenzentwicklung gegen AMP. Die wenigen bekannten Resistenzen entstehen durch Modifikationen an Membranbestandteilen, welche eine Bindung der AMP verhindern [10, 11].

In Eukaryonten liegen die Informationen zur Synthese von AMP genkodiert vor. Die Gene hierfür besitzen eine Intron-Exon-Struktur mit regulatorischer Promotorsequenz und unterliegen der für die Proteinsynthese typischen Prozessierung [12]. Das primäre Translationsprodukt ist ein Präpropeptid, von dem beim Eintritt in das endoplasmatische Retikulum das N-terminale Targetingpeptid abgespalten wird. Das inaktive Propeptid wird im weiteren Verlauf in Vesikel gespeichert und schließlich durch Verschmelzung mit der Zellmembran freigesetzt oder bei der Vereinigung mit anderen intrazellulären Vesikeln aktiviert [13].

Der Nachweis, dass die Gene für speziesspezifische AMP im Genom unterschiedlicher Säugetiere in Gruppen angeordnet vorkommen, lässt eine evolutionäre Entwicklung des AMP- Systems vermuten [14].

AMP des Menschen

Aufgrund von strukturellen Übereinstimmungen können die AMP in drei Hauptgruppen - Defensine, Cathelicidine und Histatine - eingeteilt werden. Im menschlichen Körper sind bisher 6 α -Defensine (HNP 1-4, HD 5-6) und 4 β -Defensine (HBD 1-4) bekannt [15]. α -Defensine kommen in der Granula von neutrophilen Granulozyten vor, wo sie zur Elimination phagozytierter Mikroorganismen benötigt werden [16, 17]. Weiterhin wurden α -Defensine in den Panethzellen des Dünndarms und Epithelzellen des weiblichen Urogenitaltraktes nachgewiesen [18]. β -Defensine konnten bisher aus Epithelzellen der Haut, des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege und des Urogenitaltraktes isoliert werden [1, 19, 20]. Kürzlich konnten auch in Alveolarmakrophagen β -Defensine nachgewiesen werden [21]. Die Unterscheidung der Defensine in α - und β -Subtyp wird durch die unterschiedlichen Positionen von Disulfidbrücken in den aktiven Peptiden vorgenommen, wobei diese Positionen hochkonserviert sind [22]. Die Gene, die für beide Subtypen der Defensine codieren, konnten auf dem Chromosom 8p23, als Gruppe angeordnet, lokalisiert werden [23]. Neben den Defensinen synthetisieren neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Keratinozyten sowie Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, der Vagina und der Lunge zusätzlich das einzige im menschlichen Körper bekannte antimikrobielle Cathelicidin: LL-37 [13, 24-28]. Dieses aus 37 Aminosäuren bestehende Peptid konnte, sowohl auf mRNA-Ebene als auch als aktives Peptid, in diesen Geweben nachgewiesen werden. LL-37 hat über die antimikrobiellen Effekte eines AMP hinaus die Fähigkeit bakterielles LPS zu binden und die Wirkung dieses Endotoxins zu inhibieren [29]. Das humane Gen für LL-37 wird als „cathelicidin antimicrobial peptide gene“ (CAMP-Gen) bezeichnet und ist auf Chromosom 3 lokalisiert [13].

Die humanen AMP haben sowohl im angeborenen als auch im adaptiven Immunsystem wichtige Aufgaben: Es konnte gezeigt werden, dass sie neben ihrer unspezifischen antimikrobiellen Eigenschaft auch als Modulatoren des adaptiven Immunsystems fungieren, indem sie rezeptorvermittelt chemotaktisch auf Immunzellen, wie dendritische Zellen, T-Zellen oder Phagozyten, wirken und somit direkt an der Steuerung der Entzündungsreaktion beteiligt sind [15, 30, 31]. Allerdings ist noch wenig darüber bekannt, auf welche Art und Weise AMP reguliert werden. Dass ein System zur Regulierung besteht, belegt die Tatsache, dass es neben kontinuierlich

exprimierten AMP auch solche AMP gibt, die nur in bestimmten Situationen gebildet werden [32]. Dies konnte speziell für den Gastrointestinaltrakt gezeigt werden. Während hier HBD-1 konstitutiv freigesetzt wird, konnte HBD-2 bisher nur in entzündeten Darmbereichen nachgewiesen werden. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erfolgte eine Expression von HBD-2 in Colonepithelzellen erst nach Stimulierung durch Interleukin 1 α , Interleukin 1 β oder pathogene Darmkeime, während die HBD-1 Expression unverändert blieb [33]. Das Cathelicidin LL-37 scheint ebenfalls induzierbar zu sein, da es in entzündeten Hautarealen deutlich stärker vorhanden ist, als in gesunder Haut, wobei hier noch kein direkt verantwortlicher Stimulus identifiziert werden konnte [34]. Einen interessanten Ansatz zur Aufklärung der Regulierung lieferte darüber hinaus die Entdeckung, dass *Shigella*- Bakterien, möglicherweise über die Freisetzung von Plasmid-DNA, die Fähigkeit haben sowohl die LL-37 als auch die HBD-1 Expression im Colon zu hemmen [35]. Erst hierdurch erhalten sie die Möglichkeit in die Epithelzellen des Colon einzudringen und zum bekannten Krankheitsbild der Shigellenruhr zu führen.

Hinweise auf die hohe Relevanz von AMP in der Immunabwehr lieferten verschiedene *in vivo* Studien an Mäusen. So waren Mäuse, die kein rCRAMP, einem Cathelicidin, das homolog zum LL-37 des Menschen ist, synthetisieren konnten, anfälliger für Infektionen mit Streptokokken der Gruppe A [36]. Auch ein Defekt in der Prozessierung von Defensinen führte im Mausmodell zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen mit *Salmonella typhimurium* [37]. Im Gegensatz hierzu waren Mäuse, die zusätzlich zu ihrer eigenen Immunabwehr über Gentransfer die Fähigkeit zur Produktion von humanen Defensinen erhielten, sehr viel eher in der Lage, sich einer Infektion mit *Salmonella typhimurium* zu widersetzen [38].

Die Bedeutung von humanen AMP in der Pathogenese von Krankheiten

Mittlerweile sind einige Krankheiten bekannt, bei denen Veränderungen in der Expression von AMP an der Pathogenese beteiligt zu sein scheinen. So konnte gezeigt werden, dass in Hautläsionen von Patienten, die an einer Neurodermitis litten, einer Dermatose aus dem Formenkreis der Atopie von noch ungeklärter Pathogenese, die Menge der AMP LL-37 und HBD-1 signifikant vermindert oder diese gar nicht mehr nachzuweisen waren [39]. Ein Fehlen von LL-37 und stark verminderte Mengen von

HNP 1-3 konnte auch beim Morbus Kostmann, einer kongenitalen Leukopenie, bei der es zu rezidivierenden Schleimhautinfektionen kommt, nachgewiesen werden [40]. Bei der Cystischen Fibrose (CF), einer angeborenen Stoffwechselstörung, bei der ein Cl⁻-Kanal fehlerhaft synthetisiert wird, kommt es unter anderem zur Produktion eines sehr zähen und salzreichen Lungensekretes. Der hohe Salzgehalt führt dazu, dass die für die Funktion von AMP sehr wichtige räumliche Proteinstruktur verändert wird und diese dadurch inaktiviert werden. Hierdurch wird zumindest ein Teil der rezidivierenden Schleimhautinfektionen, unter denen Patienten mit CF leiden, verursacht, da sich in einem Xenograftmodell der CF gezeigt hat, dass ein modifiziertes LL-37, das trotz hohem Salzgehalt aktiv bleibt, die Infektionsrate reduzierte [41]. Speziell im Colon, dessen Schleimhautepithel permanent einer Vielzahl von Keimen ausgesetzt ist, wurde die Rolle von AMP in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen untersucht. Hier zeigte sich, dass bei Patienten die an Morbus Crohn oder an Colitis ulcerosa litten, beides chronisch entzündliche Darmerkrankungen noch unklarer Genese, die Expression von HD-5 und HD-6 in der Kolonschleimhaut erhöht ist [42]. Beim Morbus Crohn scheint darüber hinaus auch die Regulierung des HBD-2 gestört zu sein. In entzündeten Darmbereichen konnte eine signifikant verminderte Expression von HBD-2 bestimmt werden, wobei sich die HBD-2 Expression in entzündeten Darmbereichen von Colitis ulcerosa Patienten unauffällig verhielt [43].

1.2 Peroxisome proliferator-activated receptors

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sind zytosolständige Rezeptoren und gehören der Kernrezeptorsuperfamilie an [44]. Die Rezeptoren dieser Familie haben die Eigenschaft, nach Bindung des Agonisten, im Zellkern als Transkriptionsfaktoren an bestimmte Promotorregionen der DNA zu binden. Hierfür besitzen die Kernrezeptoren jeweils eine Liganden- und eine DNA-Bindungsdomäne. Die DNA-Sequenz, an die diese Rezeptoren innerhalb eines Promotorbereiches binden können, wird auch allgemein als hormone responsive element (HRE) bezeichnet. Durch die Bindung an diese HRE tragen Transkriptionsfaktoren zur Regulierung des nachgeschalteten Gens bei. Im Falle der PPARs sind bisher 16 HRE beschrieben worden, die auch als „peroxisome proliferator response elements“ (PPREs) bezeichnet werden. Jedoch kann nur das Heterodimer aus PPAR und einem zweiten Kernrezeptor,

dem „retinoid X receptor“ (RXR) an ein PPRE binden [45]. Sowohl an RXR als auch an PPAR muss hierfür ein Ligand gebunden sein (Abb.1). Die Spezifität eines PPAR/RXR Heterodimers für ein PPRE ergibt sich aus der DNA-Sequenz des PPRE, dem PPAR- und RXR- Subtypus sowie des an den jeweiligen Rezeptor gebundenen Liganden [45]. Eine große Rolle für die PPRE-Spezifität spielt auch das Expressionsmuster der PPAR- und RXR-Subtypen in den unterschiedlichen menschlichen Geweben, da sich hierdurch nur bestimmte gewebsspezifische Kombinationen ergeben können.

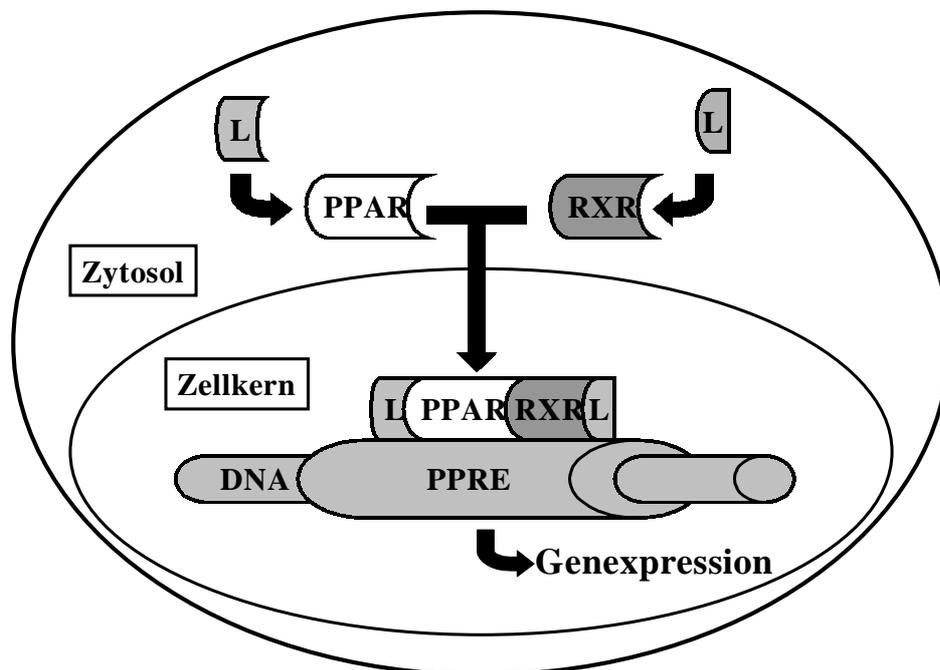


Abbildung 1 Bildung des PPAR/RXR-Heterodimers: Nach der Ligandenbindung (L) sowohl an PPAR als auch an RXR, entsteht ein Heterodimer, das als Transkriptionsfaktor an ein PPRE bindet und die Expression des nachgeschalteten Gens reguliert.

PPAR und RXR: Subtypen und Vorkommen

Die Familie der PPARs umfasst drei bisher isolierte Subtypen: α , β (auch als δ -Typ bezeichnet) und γ . Sie zeigen innerhalb ihrer DNA-Bindungsdomäne weitgehende (80%) Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, unterscheiden sich allerdings stark in ihrer Liganden-Bindungsdomäne, anhand welcher die Einteilung in die Subtypen erfolgt [46]. Im menschlichen Körper kommt der β Subtyp in fast allen Geweben vor, wohingegen $PPAR\alpha$ hauptsächlich in braunem Fettgewebe, der Leber und in

Muskelzellen nachweisbar ist [45]. PPAR γ , dem allgemein das größte Forschungsinteresse gilt, wird weiterhin auf mRNA-Ebene in drei Isoformen γ 1, γ 2 und γ 3 unterteilt, welche durch alternatives Splicen aus dem gleichen Gen abgeleitet werden [47]. Sowohl aus der γ 1 als auch der γ 3 mRNA entsteht ein identisches Protein, während das aus der γ 2 mRNA entstehende Peptid zusätzliche 28 Aminosäuren besitzt. Im menschlichen Körper kommt PPAR γ hauptsächlich in Adipozyten, Hepatozyten, Colonepithelzellen und Makrophagen vor, wobei es sich fast ausschließlich um die γ 1/3 Isoform handelt. PPAR γ 2 hat mit 20% nur in Adipozyten einen relevanten Anteil an der PPAR γ Gesamtmenge [48].

Am Beispiel von PPAR γ konnte auch erstmals belegt werden, dass eine Modulation der PPAR- Expression möglich ist. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von PPAR γ in Colonepithelzellen über den „toll like receptor-4“ (TLR-4), an den unter anderem bakterielles LPS als Ligand binden kann, gesteigert werden kann [49]. In diesem Zusammenhang ist weiterhin bekannt, dass die PPAR γ Expression in Caco-2 Zellen selektiv durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat gesteigert werden kann [50]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass im Promotorbereich von PPAR γ selber ein PPRE vorkommt, das möglicherweise in die Regulation involviert ist [51].

Die Familie der RXR umfasst drei unterschiedliche Subtypen RXR α , RXR β und RXR γ , wobei jeder Subtyp in zwei weitere Isoformen unterteilt werden kann [52]. RXR α ist hauptsächlich in Leber, Lunge und Muskeln nachweisbar. In der Leber und in Muskelzellen kommt weiterhin auch der γ -Subtyp vor, der auch aus dem Herz isoliert werden konnte. RXR β ist ubiquitär in allen menschlichen Geweben nachweisbar [53]. Es konnte gezeigt werden, dass eine gewisse Spezifität einzelner RXR für bestimmte PPAR besteht, die sich hauptsächlich aufgrund einer stabileren Bindung innerhalb des Heterodimers ergibt; jedoch ist prinzipiell jeder RXR in der Lage mit jedem PPAR zu interagieren [45]. Darüber hinaus sind neben PPAR auch noch weitere Rezeptoren aus der Familie der Kernrezeptoren bekannt, die RXR als Partner verwenden [44].

Liganden und Funktionen des PPAR/RXR Heterodimers

Im Allgemeinen werden PPAR aufgrund der vielen natürlichen Fettsäuren und Arachidonsäurederivate, die als natürliche Liganden bekannt sind, als intrazelluläre

Sensoren des Fettstoffwechselsystems angesehen. Da sich jedoch für jeden PPAR unterschiedliche Fettsäuren als Agonisten finden lassen, scheint es innerhalb dieser allgemeinen Aufgabe für jeden Subtyp speziellere Funktionen zu geben [54]. Außerdem konnten für einzelne Subtypen auch Effekte nachgewiesen werden, die über stoffwechselregulierende Prozesse hinausgehen.

Das Heterodimer aus PPAR α und RXR moduliert als Transkriptionsfaktor hauptsächlich die Expression von Proteinen, die im Lipidstoffwechsel eine regulierende Funktion haben. PPAR α /RXR fördert darüber hinaus die Differenzierung von Präadipozyten in Adipozyten. Als natürliche Liganden für PPAR α wurden eine Reihe von Prostaglandinen und Leukotrienen sowie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren beschrieben. PPAR α ist hierbei der PPAR-Subtyp mit dem größten Spektrum an Fettsäuren, die als Agonisten binden können und zeigt hierbei auch eine sehr hohe Bindungsaffinität. Des Weiteren wurden synthetische Agonisten hergestellt, von denen die Fibrate erfolgreich in der Behandlung von Fettstoffwechselstörungen eingesetzt werden. Sie reduzieren nicht nur die Triglyceridmenge im Blut, sondern beeinflussen auch das Verhältnis von „high-density lipoprotein“ (HDL) zu „low-density lipoprotein“ (LDL) positiv und mindern somit Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen [55].

Auch für PPAR β hat man einige ungesättigte und auch gesättigte Fettsäuren als Liganden charakterisieren können und darüber hinaus selektive Liganden synthetisiert, jedoch ist die Funktion des PPAR β /RXR Heterodimers noch umstritten [56]. In verschiedenen Tiermodellen konnten sowohl pro- als auch anticarcinogene Effekte beobachtet werden, wobei momentan eher von einem procarcinogenem Potential von PPAR β im Menschen ausgegangen wird [57].

Für PPAR γ sind neben 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (PGJ₂) einige mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie α -Linolensäure, als natürliche Liganden bekannt, wobei PPAR γ hier die größte Selektivität für einzelne Fettsäuren innerhalb der PPAR-Subtypen zeigt [58]. Weiterhin sind eine Reihe synthetischer Agonisten für PPAR γ entwickelt worden, wobei hier die Gruppe der Thiazolidindione eine besondere Relevanz hat [59]. Durch diese konnte gezeigt werden, dass das PPAR γ /RXR-Heterodimer einen wichtigen Regulator im Stoffwechsel von Glukose und Lipiden darstellt. Einige der Thiazolidindioneffekte auf den menschlichen Körper scheinen

durch eine Sensibilisierung verschiedener Zellen für Insulin zustande zu kommen, weswegen die Thiazolidindione auch als Insulinsensitizer bezeichnet werden und erfolgreich in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden [60]. PPAR γ Agonisten haben weiterhin einen ähnlich steigernden Effekt auf die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten wie Agonisten für PPAR α [61]. Hierbei konnte sogar schon eine Unterscheidung in der Funktion der PPAR γ Isoformen herausgearbeitet werden. In *in vitro* Versuchen mit einer Adipozytenzelllinie der Maus, die ebenfalls beide PPAR γ Isoformen besitzt, zeigte sich, dass der PPAR- vermittelte Effekt auf die Zelldifferenzierung eng an die Expression von PPAR γ 2 gebunden ist [62]. Neuere Untersuchungen über die Effekte von PPAR γ - Agonisten ergaben, dass Thiazolidindione eine entzündungshemmende Wirkung haben, welche in mehreren unterschiedlichen Mausmodellen dargestellt werden konnte [63, 64]. Hierbei wurde gezeigt, dass Thiazolidindione einen sowohl kurativen als auch protektiven Effekt auf eine chemisch induzierte Colitis der Versuchstiere hatte. Dieser Effekt ist bisher noch nicht vollständig geklärt, jedoch wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen, dass PPAR γ - vermittelt zwei wichtige intrazelluläre Signalkaskaden, der NF κ B- und der MAP-Kinase Signalweg, blockiert werden. Die Blockade dieser Kaskaden, die zum Teil durch die direkte Bindung des PPAR γ /RXR-Heterodimers an Promotorregionen der Transkriptionsfaktoren dieser Kaskaden verursacht wird, führt unter anderem zu einer verminderten Produktion entzündungsrelevanter Cytokine, wie TNF α und Interleukin 1 β [65, 66]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PGJ₂ auch unabhängig von PPAR γ /RXR die NF κ B-Kaskade blockieren kann [67].

PPAR/RXR in der Pathogenese von Krankheiten

Die potentiell wichtige Rolle von PPAR γ in der Regulation von Entzündungen im menschlichen Körper wird umso interessanter nach der Entdeckung, dass die Expression von PPAR γ in Colonepithelzellen von Patienten, die an Colitis Ulcerosa, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, leiden, signifikant niedriger ist als bei Kontrollpersonen [49]. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei Patienten mit Psoriasis gemacht, einer Erkrankung, die unter anderem durch Hyperproliferation von Keratinozyten und entzündlichen Infiltraten der Haut gekennzeichnet ist [68]. Sowohl PPAR γ als auch PPAR α sind in psoriatischer Epidermis vermindert nachweisbar.

Nachdem zunächst bei Patienten, die wegen eines Diabetes mellitus Typ II mit Thiazolidindionen behandelt wurden, eine Besserung einer gleichzeitig bestehenden Psoriasis beobachtet werden konnte, wurde auch in Zellkulturversuchen eine antiproliferative und anti-inflammatorische Wirkung von PPAR γ -Agonisten auf gesunde und auch auf psoriatische Keratinozyten nachgewiesen [69, 70]. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls im Mausmodell, in dem humane psoriatische Haut auf die Versuchstiere transplantiert wurde und sich die Hyperproliferation in den psoriatischen Läsionen des Transplantats nach oraler Thiazolidindiongabe reduzierte [71].

1.3 Ziel der vorliegenden Untersuchungen

PPAR γ Agonisten, wie die Thiazolidindione, zeigen einen kurativen und protektiven Effekt auf chemisch induzierte Colitiden. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung, ob Thiazolidindione oder PGJ₂ einen Einfluss auf die Expression humaner AMP haben und sich somit, neben den bekannten antiinflammatorischen Effekten, eine weitere Erklärung für die entzündungshemmende Wirkung von PPAR γ Agonisten findet. Hierzu wurden Zellkulturexperimente mit verschiedenen Colonepithelzelllinien und einer Prämonozytenzelllinie durchgeführt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Zellen und Zellkulturexperimente

Die humanen Kolonepithelzelllinien HT-29 (ATCC HTB-38), T-84 (ECACC 88021101) und HCA-7 (ECACC 02091238), sowie die Prämonozytenzelllinie U-937 (ACC5 DSMZ) wurden für diese Arbeit verwendet. HT-29 Zellen wurden in RPMI Medium (Life Technologies) kultiviert, dem 5% FCS und 2mM L-Glutamin zugesetzt war. T-84 Zellen wurden in Ham's F12 und DMEM Kulturmedien (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Verhältnis von 1:1 kultiviert, denen 10% FBS und 2mM Glutamin zugesetzt war. HCA-7 Zellen wurden in DMEM Kulturmedium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), dem 10% FBS und 2% Glutamin zugesetzt wurde, kultiviert. U937 Zellen wurden in RPMI Medium (Life Technologies, Paisley, UK), das mit 10% FKS angereichert war, kultiviert. Alle Zelllinien wurden entweder in 25cm² oder 75cm² Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Je 25cm² Kulturflasche wurden entweder 5*10⁵ HT-29 Zellen, 1*10⁶ T-84 Zellen, 5*10⁵ HCA-7 Zellen oder 5*10⁶ U-937 Zellen ausgesät. In 75cm² Kulturflaschen wurden jeweils 2*10⁶ HT-29, T-84 oder U-937 Zellen ausgesät. Ciglitazon (5-40µM, Tocris, Bristol, UK), Rosiglitazon (10-40µM, GSK, München), 15-deoxy-Δ^{12,14}-Prostaglandin J₂ (PGJ₂) (10-40µM, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA), BADGE (20µM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 9-cis-Retinolsäure (1µM, Sigma-Aldrich), GW9662 (20µM, Sigma-Aldrich) und Butyrat (2mM, Sigma-Aldrich) wurden dem serumfreien Medium zugefügt und die Zellen über 0, 24, 48 oder 72h inkubiert. Bei jedem Experiment wurden Kontrollzellen der gleichen Zelllinie, deren Medium nur das Lösungsmittel (DMSO bzw. Ethanol) der zur Behandlung verwendeten Substanzen enthielt, mitgeführt und zeitgleich mit den behandelten Zellen geerntet.

2.2 RNA Extraktion

Zu dem jeweiligen Zeitpunkt wurde die Gesamt-RNA aus der adhärent wachsenden Zellfraktion mittels Trifast® (Peqlab, Erlangen) extrahiert. Dazu wurde, nachdem das Nährmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt worden war, Trifast® auf die Zellen gegeben (4ml pro 75cm², 1ml pro 25cm² Zellkulturflasche) und nach kurzer Einwirkzeit

noch adhärenente Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Das entstandene Lysat wurde dann in Eppendorfgefäße überführt. Hiernach wurde 200µl Chloroform (Sigma-Aldrich) pro Gefäß zugegeben und kräftig geschüttelt. Nach 10min Einwirkzeit wurden die Eppendorfgefäße bei 13000rpm und Zimmertemperatur 5min zentrifugiert, wobei es zur Phasentrennung kam. Je 0,5ml der wässrigen Phase wurden vorsichtig abpipettiert und in Eppendorfgefäße überführt. Die erwünschte RNA-Präzipitation geschah durch Zugabe von 0,5ml Isopropanol (Sigma-Aldrich), wobei das Lysat gevortext und 15min bei Zimmertemperatur inkubiert wurde. Danach wurde für 10min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert und der Isopropanolüberstand abgegossen. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit 1ml 75% Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Holland) durch Vortexen gelöst und jeweils 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet 5min an der Luft getrocknet und in 100µl DEPC-H₂O gelöst.

2.3 RNA Aufreinigung und RNase-free DNase Behandlung

Für die RNA Aufreinigung und die DNase Behandlung wurde ein RNeasy-Kit von Qiagen (Hildesheim) verwendet und alle Reagenzien nach Herstellerangaben verarbeitet:

Zu den 100µl RNA-Lösung wurden 350µl RLT Puffer, der zuvor mit 10µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) pro ml Puffer aktiviert worden war, zugegeben und gemischt. Hierzu wurden 250µl 100% Ethanol gegeben. Die entstandenen Lysate wurde durch Pipettieren gemischt und auf je eine RNeasy-Säule gegeben und 1min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Hiernach wurde jeder Säule 350µl RW1-Puffer zugegeben und diese 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Gleichzeitig wurde die DNase Behandlung vorbereitet: es wurden je Probe 10µl DNase Stock Lösung (RNase-free DNase Set, Qiagen) zu 70µl RDD-Puffer (RNase-free DNase Set, Qiagen) gegeben und vorsichtig gemischt. Der erhaltene DNase Mix wurde direkt auf die Membranen der Säulen getropft und über 30min bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde nochmals mit 350µl RW1-Puffer gewaschen und eine Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Jede Säule wurde in ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Zwei Waschvorgänge mit 500µl RPE Puffer, der zuvor mit 100% Ethanol versetzt worden war, und nachfolgender Zentrifugation für je eine

Minute bei 13000rpm, schlossen sich an. Die Kolonnen wurden in 1,5ml Eppendorfgefäße gesetzt, 30µl RNA-freies Wasser zupipettiert und 2min bei 13000rpm zentrifugiert. Die gereinigte RNA wurde in diesen 30µl RNA-freiem Wasser gelöst und bei -80°C eingefroren.

2.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 10µl jeder RNA-Isolierung (Template) bei 94°C für 5min in einem GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems, USA) denaturiert. Gleichzeitig wurde der benötigte Reaktionsmix vorbereitet, wobei das Verhältnis zwischen Template und Reaktionsmix immer 1:1 war. Letzterer bestand aus 4µl 5x First Strand Buffer, 1,5µl 0,1M DTT, 1,0µl Reverse Transcriptase (200U/µl) (M-MLV-RT Set, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, USA), 2µl 2,5µM dNTP (Gibco), 0,5µl (40U/µl) rekombinantes Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA) und 1µl (0,05µg/µl) N6/ Random hexamer primer (Promega). Bei jeder cDNA-Synthese wurden interne Negativkontrolle mitgeführt, bestehend aus 10µl Wasser anstelle des RNA-Templates. Im GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems) wurden die Proben 40min bei 40°C gewärmt, gefolgt von einem Temperaturanstieg auf 94°C für 5min und Abkühlen der Proben auf 4°C. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.5 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR wurde nach dem Prinzip eines TaqMan Assay durchgeführt: Zunächst wurde ein Reaktionsmix, jeweils unterschiedlich für LL-37 und G3PDH, in 15ml Falcon-Röhrchen vorbereitet. Setup für G3PDH (1x): 12,50µl Absolut QPCR Master Mix (ABgene, Hamburg), 1,25µl Human GAPDH G3 [20x] (Applied Biosystems), 10,25µl RNase freies Wasser. Das G3PDH-PDAR-Housekeeping Kit amplifiziert keine G3PDH Pseudogene. Setup für LL-37 (1x): 12,5µl Absolut QPCR Master Mix, 2,5µl Forward Primer (3µM), 2,5µl Reverse Primer (3µM), 2,5µl Probe und 4µl RNase freies Wasser. Die Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer, durch Primer Express (Applied Biosystems) für die Quantifizierung von LL-37 mRNA konstruiert, waren 5'-ACC CAG CAG GGC AAA TCT C-3', beziehungsweise 5'-GAA

GGA CGG GCT GGT GAA G-3'. Die TaqMan Fluoreszenzsonde für LL-37 hatte die Sequenz 5'- TGT TAT CCT TAT CAC AAC TGA T-3' und war mit FAM markiert. Der Reaktionsmix wurde auf Eppendorfgefäße verteilt (je 96µl). Die sechsfache absteigende Verdünnungsreihe für die Standardkurve wurde hergestellt, bei GAPDH in einem Verhältnis von 1:3 und bei LL-37 1:1. Die Standardkurve wurde mit cDNA, die mit einer bekannten Menge Gesamt-RNA aus U937 Zellen hergestellt wurde, erstellt. Anschließend wurden je 4µl der Proben- oder Standard-cDNA auf die vorbereiteten Eppendorfgefäße verteilt, so dass mit 100µl ein vierfacher Ansatz entstand. Eine Ausnahme davon machte die Regelung für die Proben-cDNA bei jedem Ansatz für GAPDH. Hier wurden dem Reaktionsmix nur 1µl cDNA und 3µl Wasser pro Eppendorfgefäß zugegeben. Die Endkonzentration der Proben-cDNA war demnach nur 0,25µl auf 25µl Reaktionsvolumen. Der Ansatz wurde kurz gevortext und 1min bei 3000rpm zentrifugiert. Nun wurde die 96-Well Optical Reaction Plate (ABgene), nach festgelegtem Schema, mit jeweils 25µl pro well geladen. Alle Werte wurden in Triplikaten bestimmt, um den Fehler durch ungenaues Pipettieren zu minimieren. Es wurden Optical-Caps (ABgene) aufgesetzt und die Platte unter Lichtabschluss für 24h bei 4°C gelagert. Kurz vor dem Start der PCR-Amplifikation wurde die Platte 1min bei 1000rpm zentrifugiert und in den iCycler™ (Bio-Rad) eingesetzt. Der PCR Lauf wurde nach Eingabe der RNA-Starttranskriptwerte, für die jeweilige Standardkurve, und des Protokolls gestartet. Das Protokoll für GAPDH sah 40 Zyklen (je 15sec bei 95°C und 1min bei 60°C) vor und es wurde bei der Wellenlänge für VIC (530nm) gemessen. Das Protokoll bei LL-37 sah 50 Zyklen (je 0,15sec bei 92°C und 1min bei 60°C) vor und es wurde mit der Wellenlänge für FAM (490nm) gemessen. Die mittels der Standardkurven von der iCycler™-Software berechneten Daten für die RNA-Starttranskriptmengen, wurden anschließend in MSExcel übertragen, womit die semiquantitative Auswertung durchgeführt wurde. Zunächst wurde der Quotient aus LL-37/ GAPDH Starttranskriptmenge für jede Probe gebildet. Zur Berechnung der relativen LL-37 Induktion wurden nun die berechneten Quotienten für behandelte Zellen durch die Quotienten der unbehandelten Kontrollzellen dividiert. Die berechneten Ergebnisse entsprechen den relativen LL-37 Induktionen zum Zeitpunkt, an dem sowohl die Kontroll- als auch die behandelten Zellen geerntet wurden (0, 24, 48 oder 72h).

Alle Experimente wurden 3- bis 5-fach voneinander unabhängig wiederholt. Die Ergebnisse wurden anschließend zusammengefasst und statistisch ausgewertet.

2.6 Messung der Gesamtproteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der Lysate und Überstände wurden nach dem Prinzip eines Bradford assay photometrisch bei 750nm ermittelt. Dazu wurde 228µl PBS und 2µl Complete Lysis Buffer als Leerwert pipettiert und eine Standardkurve mit Rinderalbumin (BSA Fraction V) angesetzt. Die 1. Lösung der absteigenden Verdünnungsreihe enthielt 5mg/ml Albumin und wurde fortlaufend im Verhältnis von 1:1 mit PBS verdünnt. Pro Verdünnung wurden jeweils 5µl für die Messung entnommen, dagegen wurden nur 2µl pro Probe in jedes well geladen; jeder Wert wurde doppelt bestimmt. Dann wurden zu jedem well, außer dem Leerwert, 25µl Protein-Assay Reagent A und 200µl Reagent B (beide Bio-Rad) zugegeben. Die Platte wurde über 15min bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend die Messung gestartet. Hierzu wurde ein Tecan-Spectra-Spektroskop (Tecan) verwendet. Die Messdaten wurden in MS Excel übertragen und die Proteinkonzentration berechnet.

2.7 Kernisolierung

Es wurde das Nährmedium aus den T-75 Zellkulturflaschen abgesaugt und die verbliebenen adhärenen Zellen, mittels 5ml PBS, durch leichtes Schwenken gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS erfolgte die Zugabe von 4ml Trypsin/EDTA (Invitrogen), das nach kurzem Einwirken und leichtem Schwenken ebenfalls abgesaugt wurde. Zum Lösen der adhärenen Zellen wurden 3ml Trypsin/EDTA zugegeben, das bei HT-29 Zellen für 7min und bei T-84 Zellen für 25min bei 37°C auf den Zellen verblieb. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen, wurde die Trypsinierung durch die Zugabe von 7,1ml Medium gestoppt. Bei U-937 Zellen entfiel die Trypsinierung. Nach der Überführung der Zellsuspension in 15ml Falcon-Röhrchen erfolgte die Entnahme von 0,1ml Zellsuspension, womit die Bestimmung der Zellzahl vorgenommen wurde. Die verbliebene Zellsuspension wurde nun bei 1000rpm und 4°C 5min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Jedes Pellet wurde mit 5ml PBS/PIP

gewaschen und in 1ml eiskaltem HB-Puffer aufgenommen, in Eppendorfgefäße überführt und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 50µl Nonidet P-40 (Fluka, Buchs, Schweiz) wurde der Ansatz durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und bei 4°C und 13000rpm 30sec zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt und als cytoplasmatische Fraktion bei -80°C eingefroren. Nach Aufnahme der Pellet in 40µl Lysepuffer (Active motif Europe, Rixensart, Belgien) wurde die Kernsuspension 30min auf Eis geschüttelt und anschließend 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (s.o.) als nukleäre Fraktion bei -80°C eingefroren.

Verwendete Puffer:

Phosphatase Inhibitor Buffer (PIB)	NaF (125mM)	52mg	Sigma-Aldrich
	Beta-glycerophosphat (250mM)	0,55g	Sigma-Aldrich
	Para-nitrophenolphosphat (250mM)	1,15g	Sigma-Aldrich
	NaVO ₃ (25mM)	31mg	Fluka, Buchs, Schweiz
	Ad 10ml Aqua dest		
PIP/PBS	PIB	0,5ml	s.o.
	PBS (1x)	10ml	Invitrogen
	Unmittelbar vor Gebrauch hergestellt		
Hypotonic Buffer (HB)	HEPES (20mM)	0,24g	Sigma-Aldrich
	NaF (5mM)	12mg	Sigma-Aldrich
	Na ₂ MoO ₄ (10µM)	5µl einer 0,1M Lösung	Sigma-Aldrich
	EDTA (0,1mM)	10µl einer 0,1M Lösung	Invitrogen
	Ad 50ml Aqua dest.; mittels 1N NaOH auf pH 7,5 eingestellt		

2.8 PPAR γ Transcription Factor assay

Zur Bestimmung der PPAR γ -Aktivität wurde ein TransAM™ PPAR γ Transcription Factor Assay Kit (Active motif Europe, Rixensart, Belgien) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren:

In jedes verwendete well der 96-well Elisaplatte wurden je 40 μ l Bindepuffer vorgelegt, der 40pmol PPRE Oligonukleotide (Wildtyp) enthielt. Als Negativkontrolle wurden 10 μ l Lysepuffer, als Positivkontrolle 8 μ l Lysepuffer und 2 μ l THP-1 nukleärer Extrakt zugegeben. Von jeder aus der Kernisolierung (s.o.) stammenden nukleären Fraktion wurden je 10 μ g Gesamtprotein, gelöst in 10 μ l Lysepuffer, zugegeben. Jede Bestimmung wurde doppelt durchgeführt. Die Elisaplatte wurde verschlossen und bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln über 60min inkubiert. Anschließend wurde 3x mit je 200 μ l Waschpuffer pro well gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von jeweils 100 μ l PPAR γ Antikörper (1:1000 Verdünnung in 1x Antikörperbindungspuffer). Die Elisaplatte wurde verschlossen und bei Zimmertemperatur für 60min inkubiert. Anschließend wurde je well 3x mit 200 μ l Waschpuffer gewaschen und 100 μ l anti-goat HRP-konjugierter Antikörper (1:1000 Verdünnung in 1x Antikörperbindungspuffer) zugegeben. Die Elisaplatte wurde verschlossen und bei Zimmertemperatur über 60min inkubiert. Anschließend wurde 4x mit je 200 μ l Waschpuffer pro well gewaschen. 100 μ l Developing Solution wurden zugegeben und die Elisaplatte unter Lichtausschluss über 10min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 μ l Stop Solution beendet und die Absorption bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 655nm in einem Tecan-Spectra-Spektroskop (Tecan) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit MSEXcel, wobei von jedem Probenwert die Negativkontrolle subtrahiert wurde.

2.9 Western Blot

SDS-PAGE, Blotting und Färbung

Es wurde Sample buffer und 2-Mercapto-ethanol (Sigma) im Verhältnis von 1:4 gemischt. Je 10 μ l des Gemisches wurde zu den Proteinproben gegeben, gevortext, 3 Minuten lang auf 95°C erhitzt und danach 5min auf Eis gekühlt. Als Proteinproben wurden die nukleären Fraktionen der Kernisolierung (s.o.) verwendet, von denen jeweils 50 oder 100 μ g Gesamtprotein (Bestimmung s.o.) gelöst in Complete lysis buffer

(Active motif) pro lane eingesetzt wurden. Die Proteine wurden dann mittels SDS-PAGE (Protean II Cell, BioRad) aufgetrennt, wobei die Poly-acrylamidkonzentration je nach Größe des zu bestimmendem Proteins zwischen 10 bis 15% lag. Je höher das Molekulargewicht des gesuchten Proteins dabei war, desto niedriger wurde die Polyacrylamidkonzentration im Gel gewählt. Zusätzlich wurde in mindestens eine Geltasche 10-15µl eines farbig markierten standardisierten Proteingrößenmarkers (SDS-PAGE Standards, BioRad) geladen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch auf eine PVDF-Membran (Immobilion-membrane, Milipore, Bedford MA, USA) mittels Elektroblothing bei 200-400mA überführt (Trans Blot System, BioRad; EC-Apparatus EC140, EC-Apparatus Co., Holbrook NY, USA). Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch 5% Trockenmilchpuffer über Nacht bei 4°C oder 1h bei Zimmertemperatur und Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20 (1 x 10min) wurde der Primärantikörper aufgetragen und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf folgten 2 Waschgänge je 10min mit TBS 0,1% Tween 20 (2 x 10min). Ein weiterer Blockierungsschritt in 5% Trockenmilchpuffer und die Inkubation der Blottingmembran mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper schlossen sich an. Es wurde erneut 2x 10min mit TBS 0,1% gewaschen und der Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK) nachgewiesen.

Die Blottingmembranen wurden danach bei 4°C in 5% Trockenmilchpuffer aufbewahrt und gegebenenfalls weitere Male gefärbt. Hierzu wurde die Membran zur Ablösung gebundener Antikörper über 30 Minuten bei 65°C in Stripping Buffer inkubiert und anschließend 2x10min in TBS 0,1% Tween 20 gewaschen. Nach einem weiteren Blockierungsschritt in 5% Trockenmilchpuffer (1h, Zimmertemperatur) konnte die PVDF-Membran mit einem anderen Primärantikörper gefärbt werden.

Antikörper

Die verwendeten polyklonalen Primärantikörper vom Kaninchen (rb) sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Antikörper wurden in der aufgeführten Konzentration in 5% Trockenmilchpuffer gelöst und die Blottingmembran bei 4°C über Nacht inkubiert. Der gegen Kaninchenantikörper gerichtete sekundäre Antikörper wurde in TBS (1:2000)

gelöst. Die Inkubationszeit des Sekundärantikörpers betrug eine Stunde bei Zimmertemperatur.

Verwendete Puffer:

Stacking Buffer (4x)	Trisbase (0,5M/L)	
	Laurylsulfat SDS (0,8 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sample Buffer	Stacking Buffer (4x)	s.o.
	Glycerol (10%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Laurylsulfat (SDS) (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Bromphenolblau (0,3%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Pyronin Y (0,2%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trockenmilchpuffer	Trockenmilchpulver 5%	Fluka, Buchs, Schweiz
	Tween 20 0,1%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Natriumazid 0,1%	Merck, Schwalbach am Taunus
	In TBS (10mM Tris-HCL, 150mM NaCl)	
Stripping Buffer	2-Mercaptoethanol 100mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Laurylsulfat 2%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Tris-HCL 62,5mM	Merck, Schwalbach am Taunus
	Auf pH 6,7 eingestellt	

Tab.1

Antigen	Typ	Herkunft	Verdünnung
PPAR γ 1/2	rb IgG	Calbiochem	1:1000
PPAR γ 2	rb IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:250
Aktin	rb IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:2000

2.10 FACS-Analyse

Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurde die adhärenzte Zellfraktion trypsiniert und die entstandene Zellsuspension in ein 15ml-Tube überführt. Die Suspension wurde nun bei 900rpm und einer Temperatur von 4°C 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml eiskaltem Cold Binding Buffer (CBB; 10mM Hepes, 150mM NaCl, 2,5mM CaCl₂, 10mM MgCl₂, 20% BSA (alle Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gelöst und erneut für 10min bei 900rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in CBB mit einer Konzentration der Zellsuspension von ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml gelöst und auf Eis aufbewahrt.

Pro Probe wurden nun je 5 μ l Annexin V-FITC (Sigma-Aldrich, 10 μ g/ml in CBB) in ein 12mm x 75mm messendes Reaktionsgefäß vorgelegt, in dieses wurden nun 495 μ l der Zellsuspension überführt und sachte gevortext. Die Proben wurden nun für 13min lichtgeschützt auf Eis inkubiert und im Anschluss 5min lang bei 1000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Nun wurden 5 μ l einer Propidiumjodidlösung (Sigma-Aldrich, 50 μ g/ml in PBS) vorgelegt, das Pellet mit 500 μ l CBB gelöst und danach für 15min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen nochmals für 5min bei 1000rpm und 4°C zentrifugiert und erneut in 500 μ l CBB gelöst. Nach der Färbung wurden die Proben bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Sämtliche Schritte wurden auch jeweils mit einem Aliquot jedes Versuchsansatzes durchgeführt, ohne dass eine Färbung mit Annexin V oder Propidiumjodid vorgenommen wurde. Zur Kompensation wurde pro Versuchsansatz ein Aliquot nur mit Annexin und eines nur mit Propidiumjodid gefärbt. Die Proben wurden auf einem FACScan (Beckton Dickinson, Mannheim) nach Anregung durch einen 488nm-Laser unter Verwendung von Lysis II Software (Beckton Dickinson) gemessen,

die Messung erfolgte binnen zwei Stunden nach Abschluß der Färbung. Die Zellpopulation wurde in einem Forward Scatter (FSC) – Sideward Scatter (SSC) - Dot Plot dargestellt, FSC und SSC wurden linear definiert. Die Annexin V-Bindung wurde über die Intensität des gekoppelten FITC auf FL-1 gemessen, die Menge des gebundenen Propidiumiodids in FL-3, um eine Überstrahlung durch FITC zu vermeiden. Um eine Einstrahlen von Propidiumjodid in FL-1 zu vermeiden, wurde folgende Kompensationseinstellung durch die nur einfach gefärbten Proben ermittelt: FL-1 – FL-2: 0,2%, FL-2 – FL-1: 38,9%, FL-2 –FL-3: 42,8% und FL-3 – FL-2: 8,3%. Die Darstellung der Kanäle FL-1 und FL-3 erfolgte logarithmisch. Die Grundeinstellung zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz, ohne die eine Beurteilung der Zunahme der Fluoreszenz durch Annexin V- oder Propidiumjodid-Bindung nicht möglich wäre, wurde für jede Probe mit dem zugehörigen Leerwert vorgenommen. Es wurden bei schneller Zählrate 30.000 Zellen pro Probe gemessen. Die Daten wurden aus dem HP-Format von Lysis II mittels LIFUTIL (Hewlett-Packard LIF Utilities for the PC, © HP 1990-92) in eine MS-DOS-Datei umgewandelt. Die Auswertung erfolgte dann mit WIN.MDI 2.8 (Joseph Trotter, © 1993-98) auf einem Windows NT-Rechner. Beide Programme sind auf der TSRI Cytometry Software Page als Download zu finden. In der Auswertung wurden die Zellpopulationen wieder im FSC-SSC-Dot Plot dargestellt. Zellfragmente, die sich durch extrem niedrige Werte auszeichnen, wurden ebenso durch Setzen von Regionen ausgeklammert wie Dimere mit deutlich überhöhten Werten. Die Grenzen für eine spezifische Anfärbung mit Annexin V bzw. Propidiumjodid wurden über eine deutliche Zunahme gegenüber der unspezifischen Fluoreszenz der Leerwerte bestimmt.

2.11 Differenzierungsuntersuchung

Die Aktivität der Alkalische Phosphatase (AP) wurde verwendet, um die Differenzierung in den untersuchten Zelllinien zu messen. Die AP Aktivität ist ein anerkannter Surrogatmarker für die Kolonzellendifferenzierung. Für diese Untersuchung wurden die adhärent wachsenden Zellen mit kaltem PBS gewaschen, abgelöst, mit Ultraschall behandelt (zweimal für 20sec) und bei einer Temperatur von 4°C und 5000rpm 10 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde die AP Aktivität im Überstand

nach Hydrolyse bei pH 9,8 und 25°C gemessen (Modular, Roche Diagnostics, USA). Zellproteinkonzentrationen wurden durch eine modifizierte Lowry Untersuchung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bestimmt. Die Enzymaktivität wurde in milli-Units (mU) pro mg Protein ausgedrückt; eine Einheit entsprach der Menge an Enzymaktivität, die dafür nötig war, ein μmol Substrat in der Minute zu hydrolysieren.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von PPAR γ 1 und 2 in Kolonepithelzelllinien

Zur Darstellung der PPAR γ Expression in den verwendeten Kolonepithelzelllinien und deren möglicher Modulation durch PPAR γ - Liganden wurden Zellkulturversuche mit HT-29, T-84 und SW-480 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils mit Ciglitazon, Rosiglitazon oder als Kontrolle nur mit Nährmedium über 72h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen und der Proteinisolierung wurden die PPAR γ Subtypen mittels Western Plot nachgewiesen. Hierfür wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, von denen einer die PPAR γ Subtypen 1 und 2, der andere nur den Subtyp 2 isoliert bindet. Darüber hinaus wurde mit einem gegen Aktin gerichteten Antikörper die Proteingesamtmenge repräsentativ dargestellt. Es zeigte sich, dass in allen Zellen nach 72h alle PPAR γ Subtypen nachweisbar waren und dass sich deren Expression durch Inkubation mit PPAR γ Liganden nicht verändert (Abb.1 und 2).

Abbildung 1:

Western Plot PPAR γ 1,2



Med	Rosi	Cig	Med	Rosi	Cig	Med	Rosi	Cig
	10 μ M	10 μ M		10 μ M	10 μ M		10 μ M	10 μ M
T-84 Zellen			SW-480 Zellen			HT-29 Zellen		

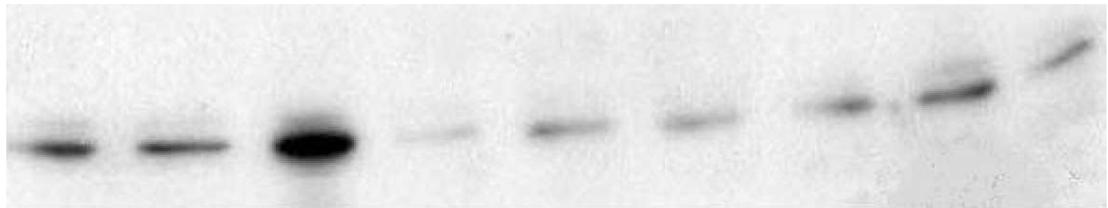
Western Plot Aktin



Med	Rosi	Cig	Med	Rosi	Cig	Med	Rosi	Cig
	10 μ M	10 μ M		10 μ M	10 μ M		10 μ M	10 μ M
T-84 Zellen			SW-480 Zellen			HT-29 Zellen		

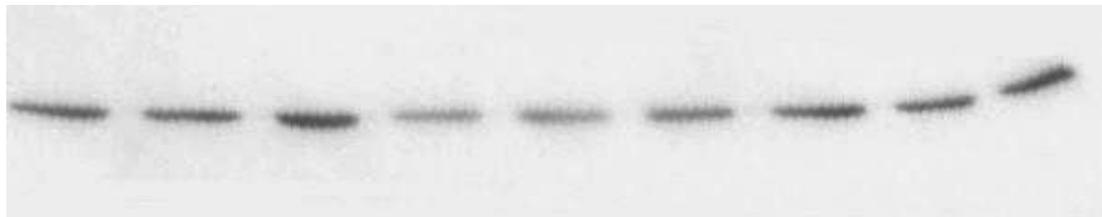
Abbildung 2:

Western Plot PPAR γ 2



Med	Rosi	Cig	Med	Rosi	Cig	Med	Rosi	Cig
	10 μ M	10 μ M		10 μ M	10 μ M		10 μ M	10 μ M
T-84 Zellen			SW-480 Zellen			HT-29 Zellen		

Western Plot Aktin



Med	Rosi	Cig	Med	Rosi	Cig	Med	Rosi	Cig
	10 μ M	10 μ M		10 μ M	10 μ M		10 μ M	10 μ M
T-84 Zellen			SW-480 Zellen			HT-29 Zellen		

3.2 Wirkung von PPAR- und RXR- Liganden auf die LL-37 Expression

Um eine mögliche Modulation der LL-37 Expression in Kolonepithelzellen durch PPAR- oder RXR- Liganden darzustellen, wurden Zellkulturexperimente mit den humanen Kolonepithelzelllinien HT-29, T-84 und HCA-7 durchgeführt. Die jeweils verwendeten Substanzen wurden für einen Zeitraum von 24, 48 oder 72h permanent auf den Zellen belassen. Alle Versuche wurden mindestens 3mal unabhängig voneinander wiederholt und zusammen mit den Kontrollzellen, die ebenfalls 24, 48 oder 72h sowohl mit dem Nährmedium als auch mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel inkubiert wurden, ausgewertet.

WY 14643 reduziert konzentrationsabhängig die LL-37 Expression in HT-29 Zellen

WY 14643 ist ein PPAR- Ligand, der prinzipiell an jeden PPAR-Subtypen binden kann, hierbei allerdings eine Präferenz für PPAR α zeigt (EC₅₀: 5 μ M). Mit zunehmender Konzentration bindet WY 14643 jedoch auch an PPAR β (EC₅₀: 35 μ M) und PPAR γ (EC₅₀: 60 μ M) (Herstellerangaben Sigma-Aldrich). Die Untersuchung der LL-37 Transkription in HT-29 Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen WY 14643 (10 μ M; 20 μ M) behandelt wurden, zeigte eine konzentrationsabhängige Reduktion der LL-37 Expression. Während bei einer Konzentration von 10 μ M keine signifikante Veränderung der LL-37 Expression über einen Zeitraum von 72h gemessen wurde, reduzierte WY 14643 in einer Konzentration von 20 μ M, sowohl nach 24 als auch nach 48h, signifikant die Transkriptionswerte für LL-37 auf etwa die Hälfte des Mediumkontrollwertes (Abb.1).

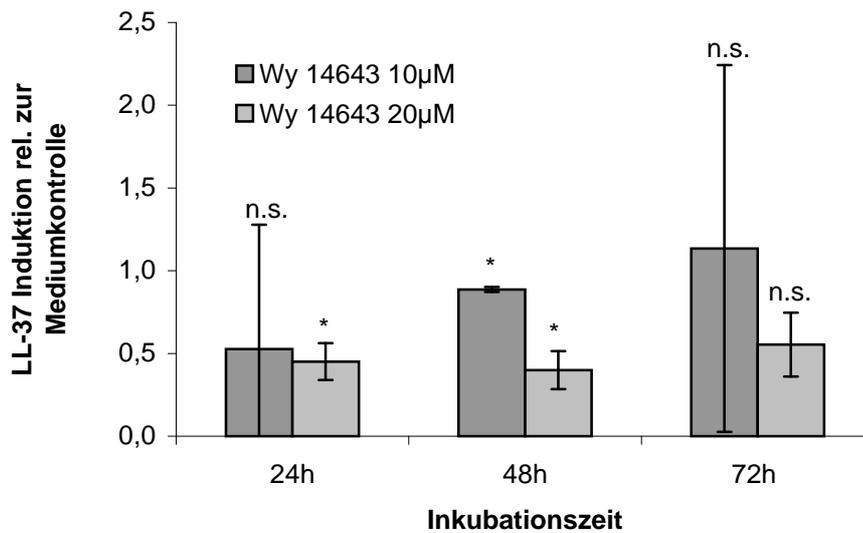


Abbildung 1: Modulation der LL-37 Expression in HT-29 Zellen durch Wy14643: Dargestellt ist die LL-37 Expression zum jeweiligen Zeitpunkt im Verhältnis zur Mediumkontrolle. Die Werte aus mindestens 3 Versuchen wurden durch semi-quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben (n.s.: nicht signifikant; * : p<0.05).

PPAR γ Agonisten modulieren zeit- und konzentrationsabhängig die LL-37 Expression in HT-29 Zellen

Zur Untersuchung der Effekte von PPAR γ - Agonisten auf die LL-37 Expression in humanen Kolonepithelzellen, wurden sowohl der einzige bisher bekannte natürliche Agonist für PPAR γ 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (PGJ₂) als auch die synthetischen Agonisten Rosiglitazon und Ciglitazon in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass alle eingesetzten PPAR γ -Agonisten zeit- und konzentrationsabhängig die LL-37 Expression in HT-29 Zellen modulieren. Die semiquantitative PCR zeigte, dass Ciglitazon ab einer Konzentration von 10µM und Rosiglitazon ab einer Konzentration von 40µM zu einer signifikanten Reduktion der LL-37 Transkriptionsrate sowohl nach 24 als auch nach 48h führte. Bei Rosiglitazon in einer Konzentration von 40mM blieb dieser Effekt auch nach 72h auf dem Niveau des 48h- Wertes, während bei Ciglitazon die 72h Werte stark streuten und es nur bei der niedrigen Konzentration von 5µM zu einer signifikanten Erhöhung der LL-37 Expression kam. PGJ₂ in einer Konzentration von 10µM führte nur nach 24h zu einer signifikanten Reduktion der LL-37 Transkriptionsrate im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb.2).

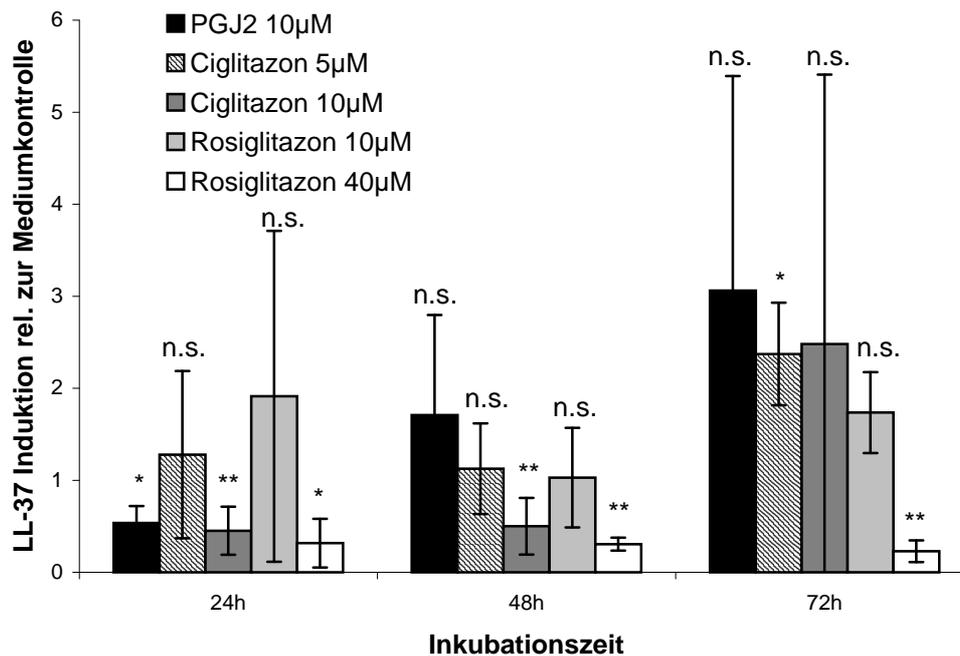


Abbildung 2: Modulation der LL-37 Expression in HT-29 Zellen durch PPAR γ -Agonisten: Dargestellt ist die LL-37 Expression zum jeweiligen Zeitpunkt im Verhältnis zur Mediumkontrolle. Die Werte aus mindestens 3 Versuchen wurden durch semi-quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben (n.s.: nicht signifikant; * : $p < 0.05$; **: $p < 0,01$).

Um ausschließen zu können, dass die Verwendung von Thiazolidindionen zu einer erhöhten Apoptoserate der behandelten Zellen führt, wurde der Anteil an apoptotischen HT-29 Zellen nach einer 24-72h Inkubation mit Ciglitazon in einer hohen Konzentration von 40µM bestimmt. Der bestimmte Anteil apoptotischer Zellen beinhaltete sowohl die Zellen, die sich in einer frühen Phase, als auch jene Zellen, die sich schon in einer weit fortgeschrittenen Phase der Apoptose befanden. Die Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befanden, wurden über die Anfärbung von auf der Zelloberfläche lokalisiertem Phosphatidylserin mittels Annexin V markiert. Als Indikator für die späte Phase der Apoptose wurde der DNA-Interchelator Propidiumbromid zur Anfärbung verwendet. Zur Messung der angefärbten Zellen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Effekte auf die LL-37 Expression durch Ciglitazon zu keinem Zeitpunkt von einer erhöhten Apoptoserate der inkubierten Zellen begleitet waren (Abb.3).

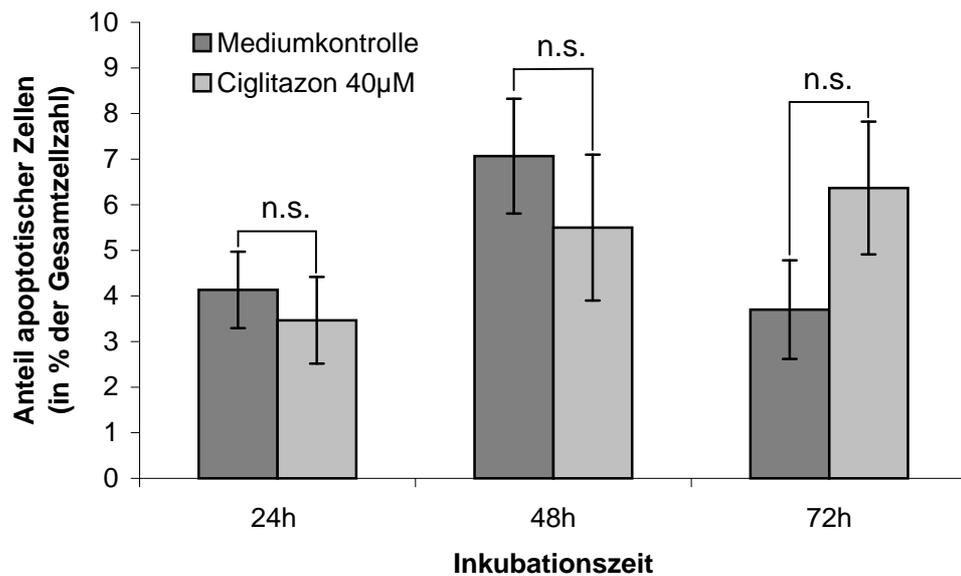


Abbildung 3: Anteil apoptotischer Zellen nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Ciglitazon: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit Ciglitazon im Vergleich zur Mediumkontrolle des jeweiligen Zeitpunktes. Die Werte wurden durch FACS-Analyse von Annexin V und Propidiumbromid gefärbten HT-29 Zellen gewonnen, gemittelt und mit der SD angegeben (n.s.: nicht signifikant).

Da PPAR γ *in vivo* in die Zelldifferenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten involviert ist, wurden auch die Effekte von PPAR γ -Agonisten auf die Differenzierungsrate von HT-29 Zellen gemessen. Hierzu wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) als Marker für die Differenzierung im Verhältnis zum zellulären Protein gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die AP-Aktivität durch Zugabe von Ciglitazon keinem Einfluss unterliegt und somit kein Einfluss auf die Zelldifferenzierung nachgewiesen werden konnte. Die gemessene AP-Aktivität war zu jedem Zeitpunkt sehr gering und zum Teil unterhalb der Nachweisgrenze. (Abb.4).

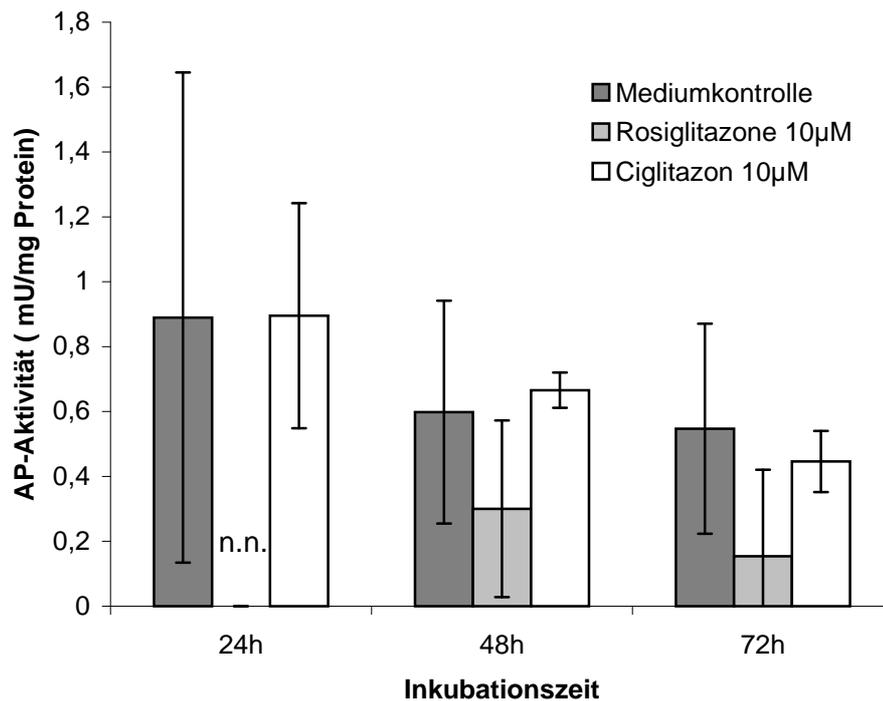


Abbildung 4: Bestimmung der AP- Aktivität in HT-29 Zellen nach Inkubation mit PPAR γ - Agonisten: Dargestellt ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) in mU pro mg zellulärem Protein, als Mittelwert aus drei Versuchen mit SD (keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben und der Mediumkontrolle; n.n.: nicht nachweisbar).

Auch in T-84 Zellen reduzieren PPAR γ -Agonisten die LL-37 Expression

Der Effekt von Ciglitazon auf die LL-37 Transkriptionsrate konnte auch in einer zweiten Kolonepithelzelllinie beobachtet werden. Schon nach 24h Inkubation von T-84 Zellen mit Ciglitazon in einer Konzentration von 10µM, kam es zu einer signifikanten Reduktion der LL-37 Expression, welche sich auch nach 48h und 72h Inkubationszeit nachweisen ließ. Die in HT-29 und T-84 beobachtete Wirkung von Ciglitazon, konnte allerdings in der dritten verwendeten Kolonepithelzelllinie (HCA-7) nicht bestätigt werden. Die semiquantitative PCR erbrachte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der LL-37 Transkriptionsrate nach Inkubation mit Ciglitazon in einer Konzentration von 10µM (Abb.5).

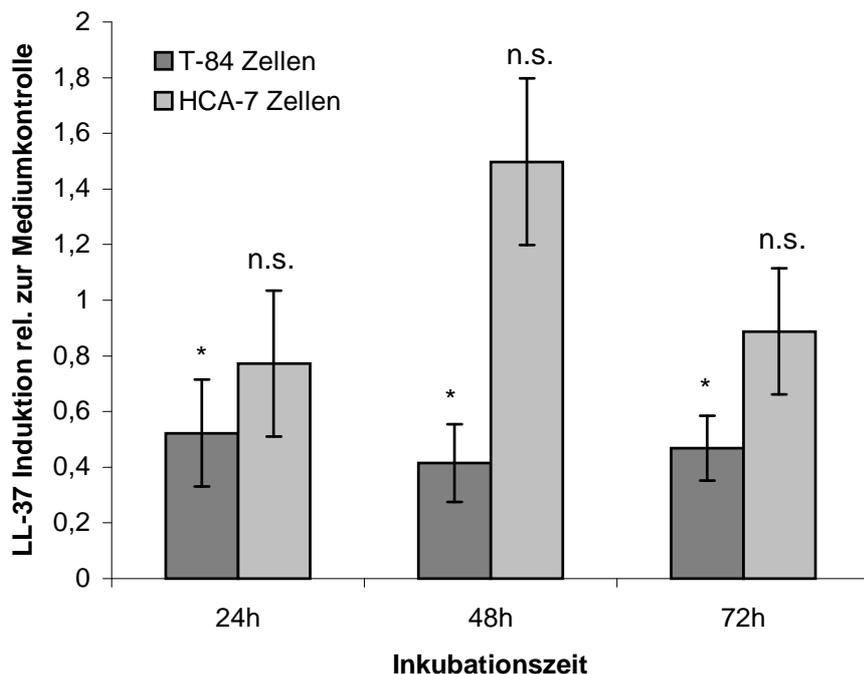


Abbildung 5: Modulation der LL-37 Expression in T-84 und HCA-7 Zellen durch Ciglitazon (10 μ M): Dargestellt ist die LL-37 Expression zum jeweiligen Zeitpunkt im Verhältnis zur Mediumkontrolle. Die Werte aus mindestens 3 Versuchen wurden durch semi-quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben (n.s.: nicht signifikant; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$).

Der PPAR γ -Antagonist BADGE induziert die LL-37 Expression in HT-29 Zellen

Bei der Untersuchung des Effektes von PPAR γ -Antagonisten auf die LL-37 Transkriptionsrate wurden zwei strukturell unterschiedliche aber beide als selektiv für den PPAR γ -Subtyp geltende Substanzen, BADGE und GW9662, verwendet. Hierbei zeigte sich, dass BADGE nach 24h zu einer signifikanten, etwa 6-fachen Induktion von LL-37 führte, jedoch die Inkubation mit GW9662 zu keiner Erhöhung der LL-37 Transkriptionsrate führte. GW9662 führte im Gegensatz dazu nach 24 und auch nach 72h zu einer signifikanten Reduktion der LL-37 Expression. Einen ähnlichen Effekt liess sich bei der Kombination von Ciglitazon mit GW9662 beobachten. Während hierbei nach 24h noch keine signifikante Änderung der LL-37 Expression erfolgte, wurde sowohl nach 48 als auch nach 72h die LL-37 Transkriptionsrate signifikant reduziert (Abb.6).

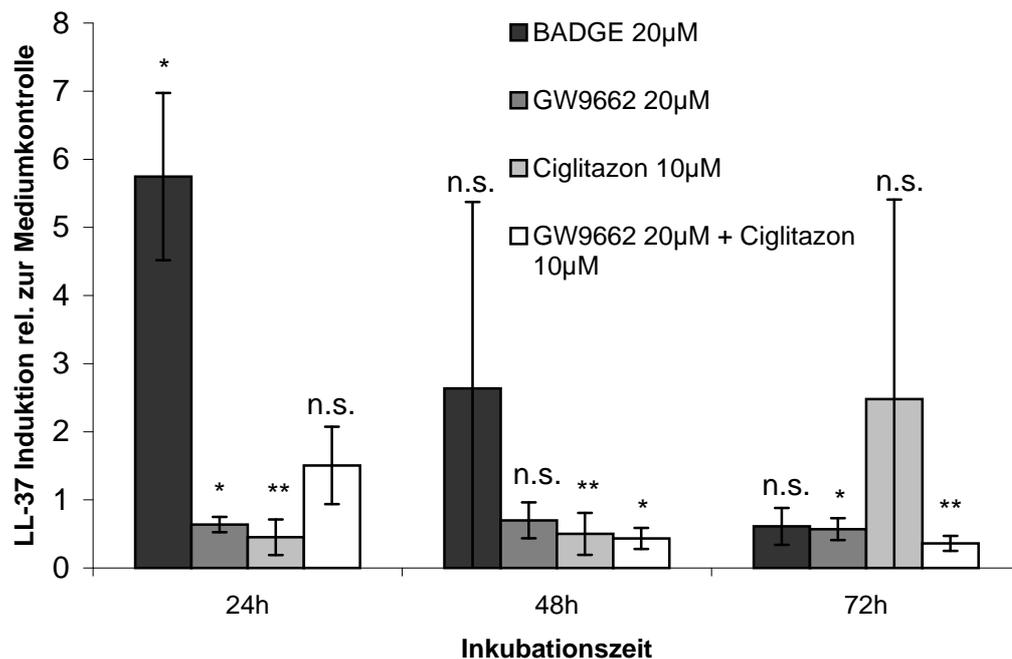


Abbildung 6: Modulation der LL-37 Expression in HT-29 Zellen durch PPAR γ -Antagonisten: Dargestellt ist die LL-37 Expression zum jeweiligen Zeitpunkt im Verhältnis zur Mediumkontrolle. Die Werte aus mindestens 3 Versuchen wurden durch semi-quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben (n.s.: nicht signifikant; * : $p < 0.05$; **: $p < 0,01$).

RXR- Agonisten zeigen kein Effekt auf die LL-37 Expression in HT-29 Zellen

Um die Wirkung von Liganden des „retinoid-X-receptor“ (RXR) auf die LL-37 Expression in Kolonepithelzellen zu untersuchen, wurde die für diesen Rezeptortyp als Agonist bekannte 9-cis-Retinolsäure eingesetzt. Hierbei wurden weder in HT-29 Zellen, die nur mit Retinolsäure behandelt wurden, noch in Zellen, die mit Ciglitazone und Retinolsäure kokubiert wurden, eine signifikante Veränderung der LL-37 Expression beobachtet (Abb.7).

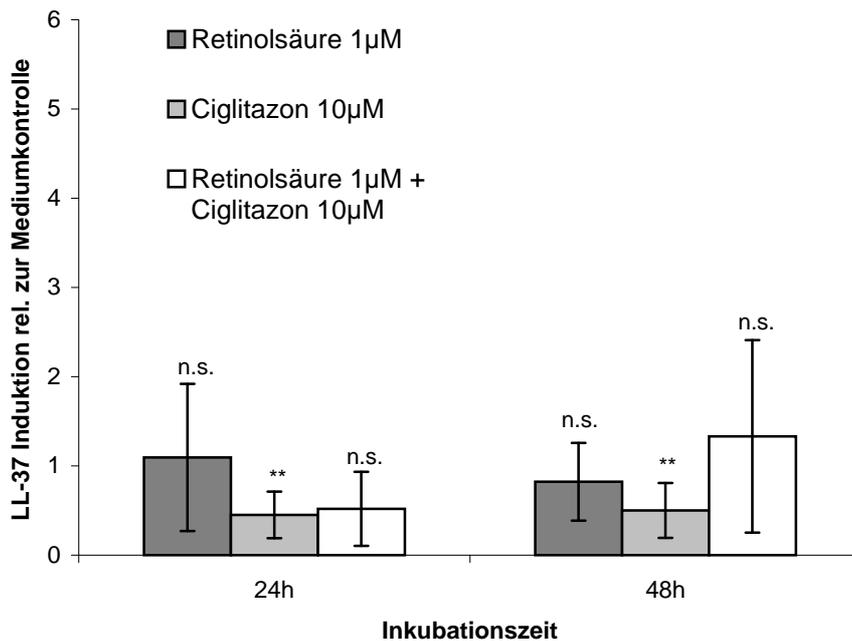


Abbildung 7: Modulation der LL-37 Expression in HT-29 Zellen durch RXR- Agonisten: Dargestellt ist die LL-37 Expression zum jeweiligen Zeitpunkt im Verhältnis zur Mediumkontrolle. Die Werte aus mindestens 3 Versuchen wurden durch semi-quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben (n.s.: nicht signifikant; * : p<0.05; **: p<0,01).

Auch der Differenzierungsgrad von HT-29 Zellen, die mit Retinolsäure oder mit einer Kombination aus Retinolsäure und Ciglitazon inkubiert wurden, veränderte sich nicht signifikant im Vergleich zu Mediumkontrollzellen. Hierfür wurde in den Zellen wiederum die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) als Marker für die Differenzierung im Verhältnis zum zellulärem Protein bestimmt. Die AP-Aktivität war auch hier bei allen untersuchten Zellen sehr niedrig und lag teilweise unter der Nachweisgrenze (Abb.8)

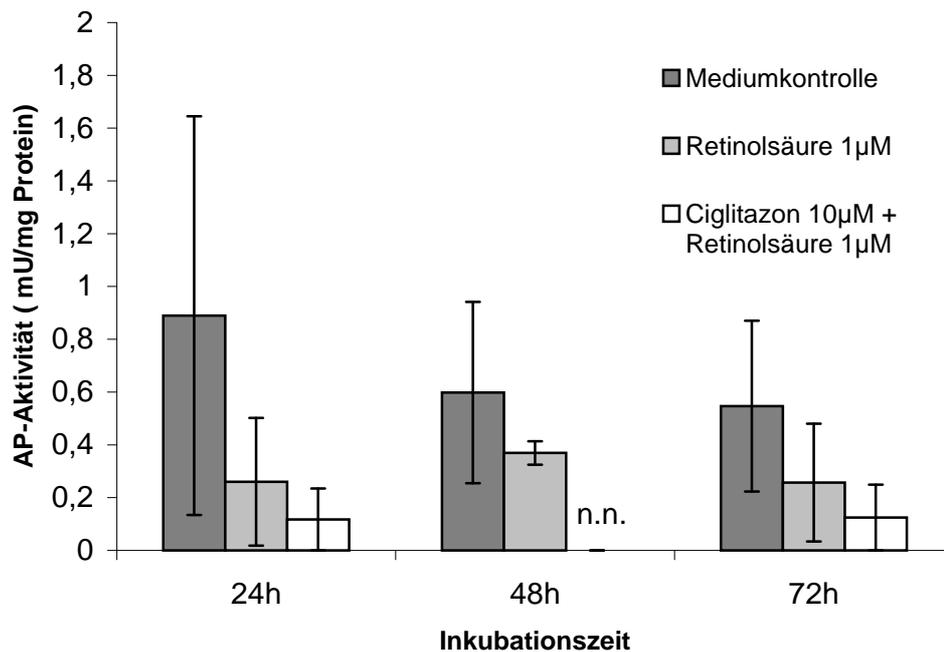


Abbildung 8: Bestimmung der AP-Aktivität in HT-29 Zellen nach Inkubation mit RXR Agonisten: Dargestellt ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) in mU pro mg zellulärem Protein, als Mittelwert aus drei Versuchen mit SD (keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben und der Mediumkontrolle; n.n.: nicht nachweisbar).

PPAR γ -Agonisten reduzieren sowohl die Butyrat induzierte LL-37 Expression als auch die Butyrat induzierte Zelldifferenzierung

Butyrat ist eine kurzkettige Fettsäure, die *in vitro* auf Kolonepithelzelllinien wie HT-29 eine Vielzahl von Effekten ausübt. So induziert Butyrat unter anderem, sowohl die LL-37 Expression als auch die Differenzierung der Zellen. Die PPAR γ Agonisten Ciglitazon und Rosiglitazon zeigten bei einer Koinkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat nach 48 und auch nach 72h eine signifikante Inhibierung der LL-37 Expression im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen, die nur mit Butyrat behandelt wurden (Abb.9).

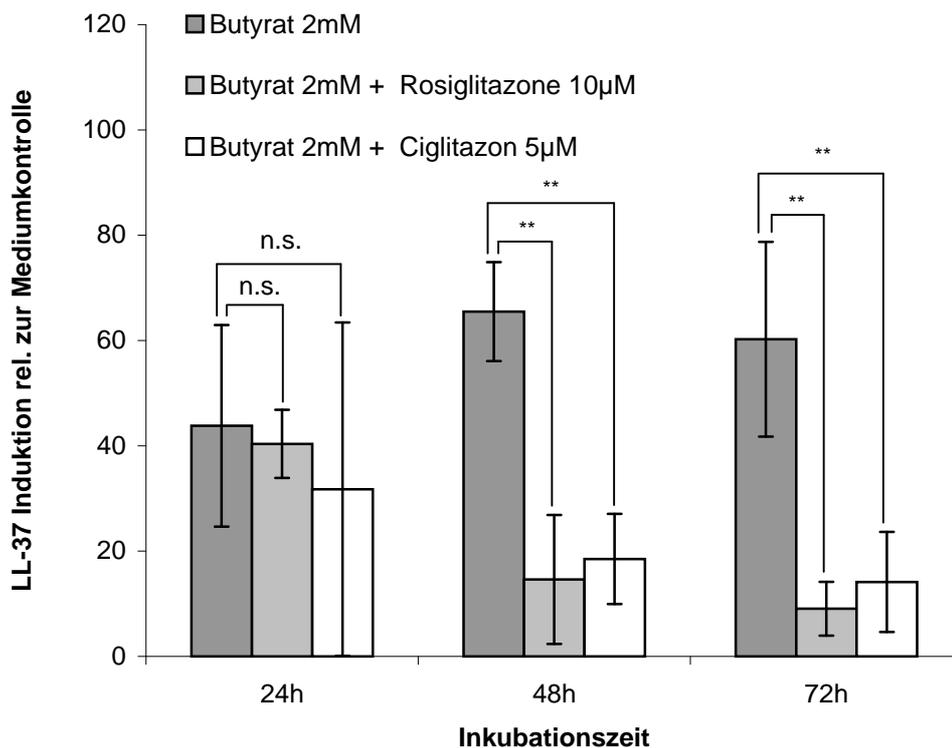


Abbildung 9: Modulation der Butyrat- induzierten LL-37 Expression in HT-29 Zellen durch PPAR γ - Agonisten: Dargestellt ist die LL-37 Expression zum jeweiligen Zeitpunkt im Verhältnis zur Mediumkontrolle. Die Werte aus mindestens 3 Versuchen wurden durch semi-quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben (n.s.: nicht signifikant; * : p<0.05; **: p<0,01).

Auch die Butyrat- induzierte Steigerung der Differenzierung von Kolonepithelzelllinien liess sich durch den Einsatz von PPAR γ - Agonisten inhibieren. Dies zeigte sich bei einer Koinkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat und Ciglitazon signifikant nach 72h und bei einer Koinkubation von Butyrat mit Rosiglitazon schon nach einer Inkubationszeit von 48h. Als aussagekräftiger Parameter diene auch hier die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) im Verhältnis zum zellulären Protein in HT-29 Zellen (Abb.10).

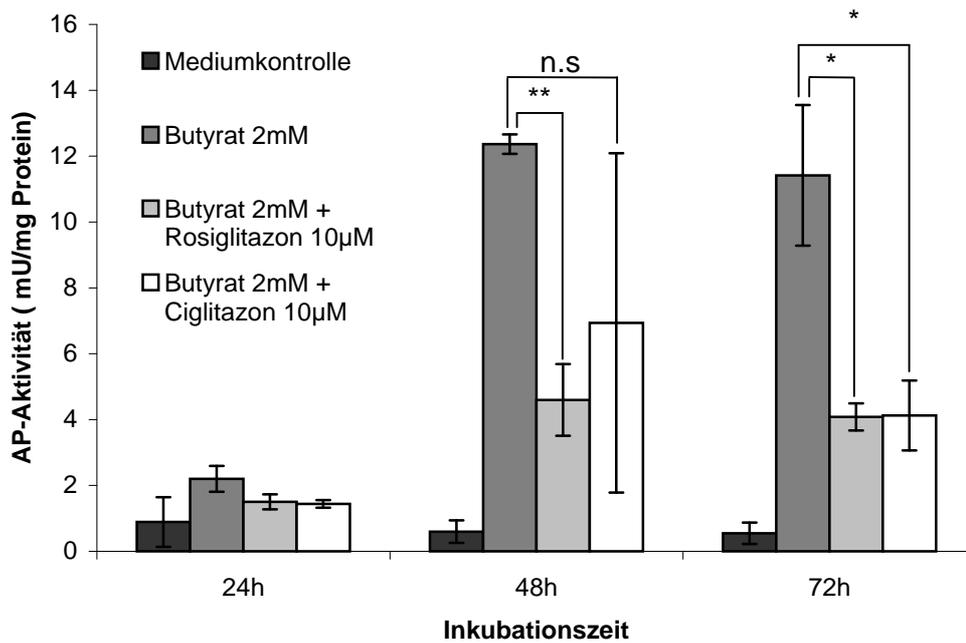


Abbildung 10: Bestimmung der AP-Aktivität in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat und/oder PPAR γ -Agonisten: Dargestellt ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) in mU pro mg zellulärem Protein, als Mittelwert aus drei Versuchen mit SD (n.s.: nicht signifikant; * : $p < 0.05$; **: $p < 0,01$).

3.3 Wirkung von PPAR γ -Liganden auf die LL-37 Expression im Verhältnis zur PPAR γ -Aktivität im Zellkern

Um einen Anhalt dafür zu erhalten, ob die Veränderung der LL-37 Expression durch die PPAR γ -Liganden einen PPAR γ abhängigen Effekt darstellen, wurde die PPAR γ Aktivität im Zellkern der behandelten Zellen gemessen. Hierbei wurde mittels ELISA nur der Anteil an PPAR γ /RXR bestimmt, der als aktiver Transkriptionsfaktor an das verwendete „peroxisome proliferator response element“ (PPRE) binden konnte. Hierbei handelt es sich um eine Consensussequenz von Promotoren, an die PPAR γ binden kann. Hierzu wurden je zwei voneinander unabhängige Zellkulturversuche durchgeführt und in den nach 72h geernteten Zellen sowohl die LL-37 Transkriptionsrate im Cytosol als auch die PPAR γ Aktivität im Zellkern im Verhältnis zum nukleären Gesamtprotein bestimmt.

PPAR γ -Aktivität und LL-37 Expression verändern sich unabhängig voneinander in HT-29 Zellen

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Butyrat induzierte LL-37 Expression in HT-29 Zellen ohne signifikante Änderung der PPAR γ Aktivität erfolgt. Von den PPAR γ -Agonisten war nur Ciglitazon in der Lage die PPAR γ Aktivität im Zellkern von HT-29 Zellen signifikant zu erhöhen und führte analog zu den 72h Werten der Vorversuche zu keiner LL-37 Induktion. Interessanterweise führte der PPAR γ -Antagonist BADGE zwar zu einer signifikanten Erhöhung der LL-37 Transkriptionsrate, allerdings zu keiner signifikanten Reduktion der PPAR γ -Aktivität im Zellkern. Diese trat jedoch während der Koinkubation von BADGE mit Ciglitazone auf, was auch zu einer starken Induktion von LL-37 führte. Diese Induktion war allerdings wegen der großen Streuung nicht signifikant im Vergleich zur Mediumkontrolle. Eine Koinkubation von Rosiglitazone und BADGE führte zu keiner signifikanten Änderung der bestimmten Parameter (Abb.11).

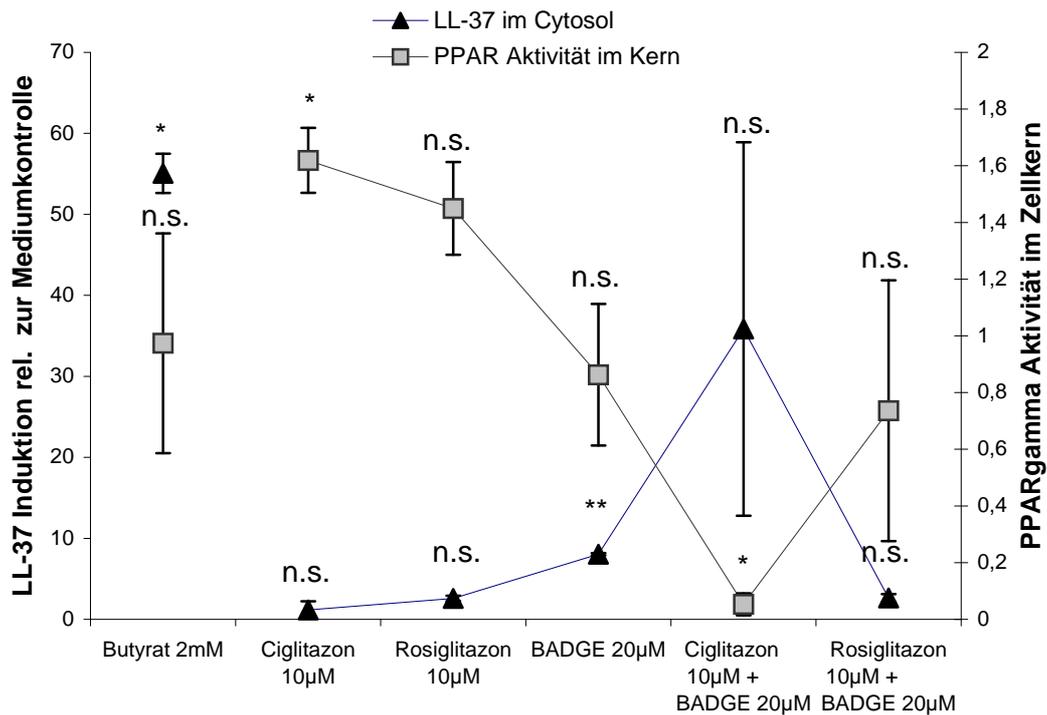


Abbildung 11: Modulation der LL-37 Expression in HT-29 Zellen in Abhängigkeit zur PPAR γ -Aktivität: Dargestellt ist PPAR γ -Aktivität im Zellkern und die LL-37 Transkriptionsrate des Cytosols nach 72h im Verhältnis zur Mediumkontrolle aus zwei unabhängigen Versuchen. Die LL-37 Werte wurden durch quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben. Die PPAR γ -Aktivität wurde mittels Elisa bestimmt, ebenfalls gemittelt und mit der SD angegeben. (n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0,01$).

PPAR γ -Aktivität und LL-37 Expression verändern sich unabhängig voneinander in T-84 Zellen

Um die Ergebnisse aus den HT-29 Zellkulturversuchen zu bestätigen, wurden T-84 Zellen unter gleichen Bedingungen untersucht. Es zeigte sich, dass die Butyrat induzierte LL-37 Expression in dieser Zelllinie von einer signifikanten Reduktion der PPAR γ Aktivität begleitet wurde. Die PPAR γ Agonisten Ciglitazon und Rosiglitazon änderten die PPAR γ Aktivität dahingegen nicht signifikant, wobei die Wirkung auf die LL-37 Expression allerdings den Vorversuchen entsprach. Nach 72-stündiger Ciglitazoninkubation wurde die LL-37 Transkriptionsrate nach 72h signifikant auf die Hälfte des Mediumwertes reduziert, während die Inkubation mit Rosiglitazon zu keiner signifikanten Änderung führte. Auch BADGE beeinflusste die PPAR γ Aktivität nicht, induzierte aber, analog zu den in den HT-29 Zellen gemessenen Werten, die LL-37 Expression signifikant um das 9-fache des Mediumkontrollwertes. Anders als in HT-29

Zellen führte auch die Koinkubation von BADGE und Ciglitazon nicht zu einer signifikanten Reduktion der PPAR γ Aktivität, allerdings zu einer signifikanten, 120-fachen, Induktion der LL-37 Transkriptionsrate im Cytosol. Die Koinkubation von Rosiglitazon und BADGE dahingegen reduzierte zwar die PPAR γ Aktivität signifikant, induzierte allerdings nur eine 10-fachen Erhöhung der LL-37 Expression (Abb.12).

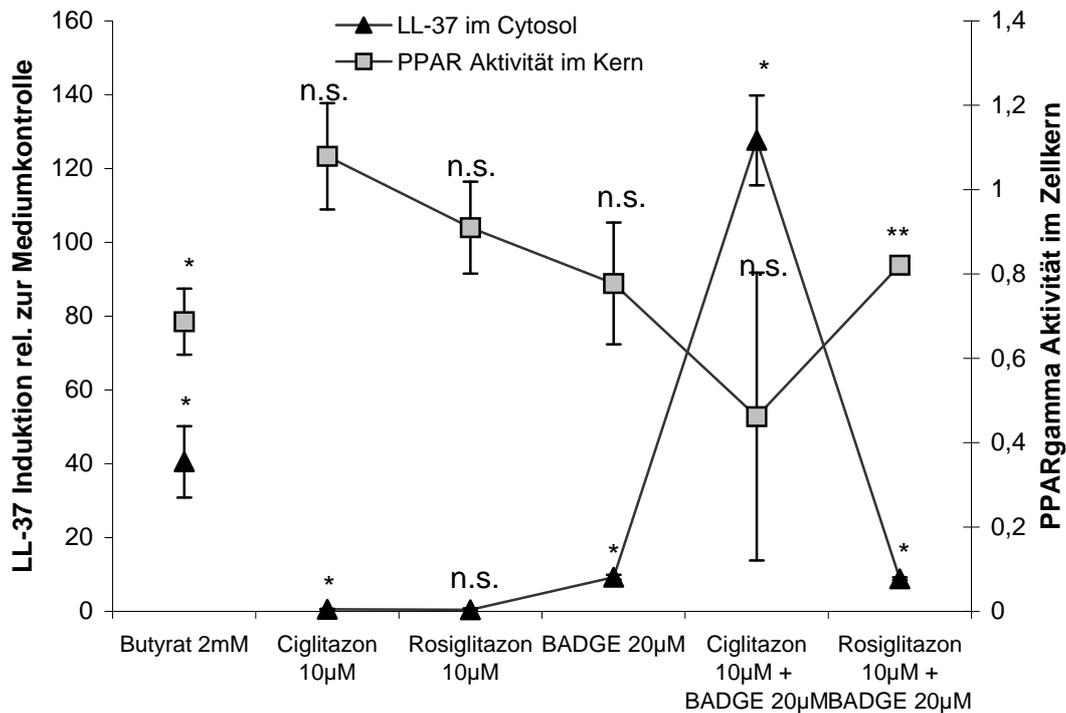


Abbildung 22: Modulation der LL-37 Expression in T-84 Zellen in Abhängigkeit zur PPAR γ -Aktivität: Dargestellt ist PPAR γ -Aktivität im Zellkern und die LL-37 Transkriptionsrate des Cytosols nach 72h im Verhältnis zur Mediumkontrolle aus zwei unabhängigen Versuchen. Die LL-37 Werte wurden durch quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben. Die PPAR γ -Aktivität wurde mittels Elisa bestimmt, ebenfalls gemittelt und mit der SD angegeben. (n.s.: nicht signifikant,*: p<0,05; **: p<0,01).

PPAR γ -Aktivität und LL-37 Expression verändern sich auch in U-937 Zellen unabhängig voneinander

Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die Effekte von PPAR γ -Liganden auf die PPAR γ Aktivität und die LL-37 Expression in Kolonepithelzelllinien auch auf andere Zellen zutreffen, wurde die Promonozytenzelllinie U-937 unter den gleichen Versuchsbedingungen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass auch in dieser Zelllinie die Induktion der LL-37 Expression nach Butyratinkubation von einer signifikanten Reduktion der PPAR γ Aktivität im Zellkern begleitet wurde. Die PPAR γ

Agonisten Ciglitazon und Rosiglitazon führten zwar beide zu einer signifikanten Reduktion der LL-37 Transkriptionsrate, allerdings wiesen sie deutliche Unterschiede in der PPAR γ Aktivität auf. Während Ciglitazon zu keiner signifikanten Änderung führte, reduzierte Rosiglitazone signifikant die PPAR γ Aktivität im Zellkern von U-937 Zellen. Im Unterschied zu den beiden Kolonepithelzelllinien führte die Inkubation mit BADGE zu keiner Induktion von LL-37, obwohl es gleichzeitig zu einer signifikanten Reduktion der PPAR γ Aktivität kam. Analog zu den Ergebnissen aus den HT-29 Zellkulturversuchen führte auch in U-937 Zellen die Koinkubation von Ciglitazon und BADGE zu einer signifikant niedrigeren PPAR γ Aktivität, aber nicht zu einer Änderung der LL-37 Expression. Auch die Koinkubation von Rosiglitazone und BADGE bewirkte keine signifikante Änderung der LL-37 Transkriptionsrate im Cytosol, bei jedoch signifikant niedriger PPAR γ Aktivität (Abb.13).

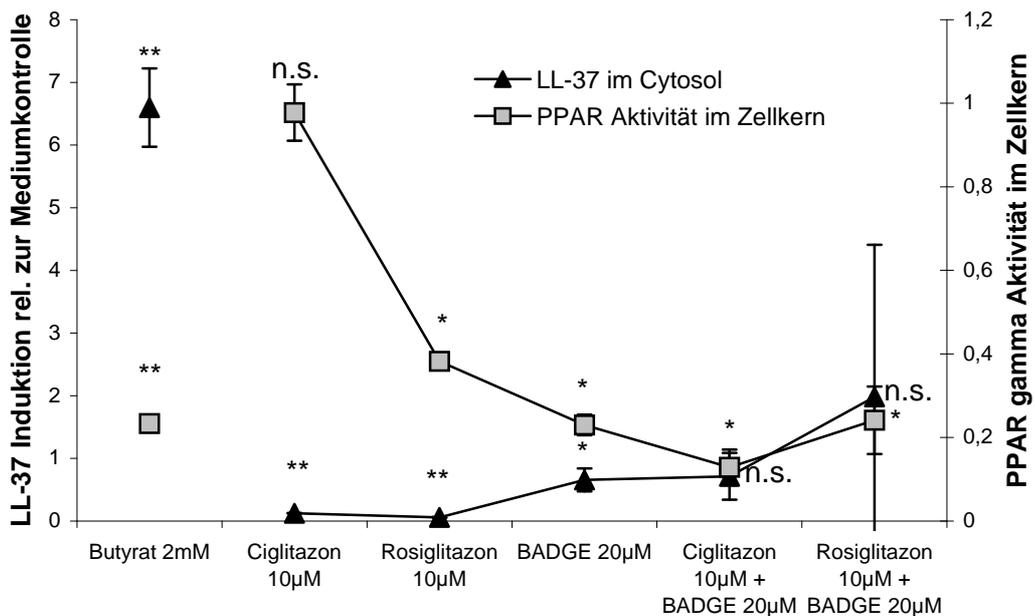


Abbildung 13: Modulation der LL-37 Expression in U-937 Zellen in Abhängigkeit zur PPAR γ -Aktivität: Dargestellt ist PPAR γ -Aktivität im Zellkern und die LL-37 Transkriptionsrate des Cytosols nach 72h im Verhältnis zur Mediumkontrolle aus zwei unabhängigen Versuchen. Die LL-37 Werte wurden durch quantitative Real-Time RT-PCR bestimmt, gemittelt und mit der SD angegeben. Die PPAR γ -Aktivität wurde mittels Elisa bestimmt, ebenfalls gemittelt und mit der SD angegeben. (n.s.: nicht signifikant; *: p<0.05; **: p<0,01).

4. Diskussion

Das Immunsystem des Menschen muss sich permanent mit unterschiedlichen pathogenen und nicht pathogenen Organismen auseinandersetzen. Dies trifft besonders auf Organe zu, die eine Barriere zwischen dem Körper und der Außenwelt aufrecht halten müssen, wie die Haut, die Lunge oder der Gastrointestinaltrakt. Hierbei nimmt der Gastrointestinaltrakt eine besondere Stellung ein, da er eine Population von bis zu 10^{14} Bakterien beherbergt, die sich aus über 500 verschiedenen Arten zusammensetzt [72]. Die Anwesenheit einer solchen Menge an zum Teil pathogenen Keimen setzt eine effiziente antimikrobielle Abwehr voraus. Diese Abwehrfunktion wird zum Großteil vom einschichtigen Kolonepithel übernommen, welches eine ganze Reihe von Immunmediatoren produziert, unter denen die antimikrobiellen Peptide eine wichtige Komponente darstellen. Zu den antimikrobiellen Peptiden des Menschen gehören die verschiedenen Subtypen der Defensine und das einzige bekannte Cathelicidin LL-37 [13, 15]. Diesen Peptiden kommt nicht nur eine generelle antimikrobielle Aufgabe zu: Boman et al stellten die These auf, dass gerade diese Peptide wichtige Regulatoren der natürlichen Darmflora sind und für die für jeden Darmabschnitt spezielle Zusammensetzung der besiedelnden Bakterien verantwortlich sind [4]. Diese These wird unterstützt von Ergebnissen, die zeigten, dass die unterschiedlichen humanen antimikrobiellen Peptide in den verschiedenen Darmanteilen selber auch ein spezielles Expressionsmuster aufweisen. So gibt es antimikrobielle Peptide, die permanent produziert und expremiert werden und andere, die nur im Falle einer Infektion mit bestimmten pathogenen Keimen vom Immunsystem eingesetzt werden [73]. Inzwischen sind eine Reihe von Erkrankungen der Haut, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes bekannt, bei denen eine mögliche Beteiligung dieser Peptide in der Pathogenese diskutiert wird [42] [39] [40]. Jedoch ist noch sehr wenig über die Regulation der Synthese und Expression der antimikrobiellen Peptide bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals untersucht, ob eine mögliche Beteiligung des Peroxisome proliferator-activated Receptor γ an der Regulation der humanen antimikrobiellen Peptide besteht. Hierzu wurden Zellkulturexperimente mit Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt, bei denen sowohl synthetische als auch natürliche Liganden für PPAR γ zum Einsatz kamen.

Expression von PPAR γ in humanen Koloncarcinomzelllinien

PPAR γ ist ein Rezeptor, der in vielen humanen Geweben vorkommt. Hierbei ist die Expression im Fettgewebe, der Leber und im Kolon am relevantesten, wobei es sich fast ausschließlich um den γ 1/3 Subtyp handelt. Nur im Fettgewebe kommt PPAR γ 2 in bedeutenden Mengen vor. In unseren Experimenten zeigte sich jedoch, dass sowohl in HT-29 als auch in T-84 Zellen nicht nur der γ 1/3 Subtyp, sondern auch PPAR γ 2 nachweisbar ist. Die PPAR γ Expression verhielt sich hierbei über eine Inkubationszeit von 72h konstant.

Modulation der LL-37 Expression

Die Thiazolidindione sind synthetische Liganden für PPAR γ und wirken nach der Bindung an diesen Rezeptor als Agonisten. Zu ihnen gehören eine ganze Reihe von Medikamenten, die in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden. Es konnte bei Patienten, die im Rahmen ihrer Diabetestherapie mit diesen Medikamenten behandelt wurden, eine Linderung einer gleichzeitig bestehenden Colitis nachgewiesen werden, ein Effekt, der auch in verschiedenen Tiermodellen zu sehen war [74] [64].

In unseren Experimenten wurden Kolonkarzinomzelllinien mit unterschiedlichen Dosierungen von Vertretern aus der Gruppe der Thiazolidindione inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Ciglitazon in einer Dosierung von 10 μ M nach 24 und 48 Stunden, als auch Rosiglitazon in einer Dosierung von 40 μ M nach 24, 48 und 72h, die LL-37 Expression in HT-29 Zellen signifikant vermindern. Die LL-37 Expression der mit Thiazolidindionen behandelten Zellen wurden hierbei auf etwa die Hälfte der Expression in den Kontrollzellen reduziert. Auch die Inkubation von HT-29 Zellen mit dem natürlichen Liganden für PPAR γ , PGJ₂, reduzierte die LL-37 Expression signifikant nach 24h, wobei dieser Effekt nach 48h und 72h nicht mehr nachzuweisen war. Die Reduktion der LL-37 Expression wurde weder von einer erhöhten Apoptoserate, noch von einer Änderung der Differenzierungsrate der behandelten Zellen begleitet. Dies zeigten die Nachweise der Aktivität der alkalischen Phosphatase als Differenzierungsmarker und die FACS-Analyse der Apoptosemarker Phosphatidylserin und Propidiumbromid. Den modulierenden Einfluss auf die LL-37 Expression in HT-29 Zellen durch Ciglitazon konnten wir auch bei der zweiten verwendeten Zelllinie, T-84, beobachten. Zum Nachweis, dass der Effekt auf die LL-37

Expression, PPAR γ selektiven Substanzen vorbehalten ist, folgten nun Zellkulturexperimente mit WY14653. Dieses ist in niedriger Dosierung ein selektiver Agonist für PPAR α , mit steigender Dosierung bindet WY14653 jedoch auch an PPAR γ . Bei der Durchführung der Experimente konnte keine modulierende Wirkung auf die LL-37 Expression durch WY16453 in einer Konzentration von 10 μ M beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 20 μ M zeigte sich nun wiederum eine Reduktion der LL-37 Expression, was durch den nun einsetzenden Agonismus an PPAR γ zu erklären sein könnte.

Um die zu beobachteten Effekte der PPAR γ - Agonisten auf die LL-37 Expression der Gegenprobe zu unterziehen, wurden nun zwei PPAR γ - Antagonisten, BADGE und GW9662, eingesetzt. In einer Konzentration von je 20 μ M wurden HT-29 Zellen mit beiden Substanzen inkubiert. Nur unter der Einwirkung von BADGE kam es hierbei zu einem signifikanten LL-37 Anstieg nach 24h Inkubationszeit. Die Experimente mit GW9662 zeigten, dass dieser PPAR γ - Antagonist keine eigene Wirkung auf die LL-37 Expression besitzt, jedoch bei 24h Koinkubation mit Ciglitazon, dessen signifikante Hemmung der LL-37 Expression antagonisiert. Diese divergierenden Ergebnisse zwischen den zwei eingesetzten PPAR γ - Antagonisten lassen sich möglicherweise durch einige bekannte Unterschiede zwischen den beiden Substanzen erklären. Während GW9662 ein moderner, hoch selektiver Antagonist für PPAR γ ist, ist BADGE eine Substanz, für die neben dem Antagonismus an PPAR γ auch von PPAR γ unabhängige Wirkungsweisen nachgewiesen wurden. Fehlberg et al wiesen eine durch BADGE bewirkte Apoptose von HCT-116 Zellen, einer humanen Koloncarcinomzelllinie, nach, die über einen PPAR unabhängigen Weg vermittelt wurde [75]. Der in unseren Experimenten beobachtete Unterschied zwischen dem reinen PPAR γ - Antagonist GW9662 und BADGE könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Modulierung der LL-37 Expression durch PPAR γ - Agonisten und Antagonisten einen von PPAR unabhängigen Weg nimmt.

Bisher konnte nur sehr wenigen Substanzen ein modulierender Effekt auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden nachgewiesen werden. Zu diesen gehören einige kurzkettige Fettsäuren, die als natürliche Nahrungsbestandteile im Lumen des Colon vorkommen. Eine besondere Stellung nimmt hierbei Butyrat ein, dessen Effekte auf das Colonepithel intensiv untersucht wurden [76]. Es konnte gezeigt werden, dass

Butyrat einen bedeutenden Energielieferanten für die Kolonozyten darstellt und damit sehr wichtig für das Wachstum und das Überleben des Kolonepithels ist [77]. In verschiedenen Zellkulturexperimenten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Butyrat die Differenzierung von Koloncarcinomzelllinien fördert und gleichzeitig die Expression von LL-37 steigert. Hase et al postulieren zwischen diesen beiden Beobachtungen einen Zusammenhang, da dies den Verhältnissen im Kolon weitgehend entspricht [78]. Auch in Biopsien normaler Kolonschleimhaut konnte gezeigt werden, dass die LL-37 Expression mit dem Differenzierungsgrad der Kolonozyten korreliert, da nur die reifen ausdifferenzierten Zellen, die sich am luminalen Ende der Krypten befinden, LL-37 exprimieren. In unseren Experimenten mit HT-29 Zellen bestätigten sich die vorbeschriebenen Effekte von Butyrat sowohl hinsichtlich der Induktion von LL-37 als auch der Förderung der Differenzierung. Die LL-37 Expression lag über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72h im Mittel über dem 40-fachen der Expression, die in den Kontrollzellen vorlag. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase, die als anerkannter Marker der Differenzierung gemessen wurde, stieg nach 48 und 72h Inkubation über das 10-fache der gemessenen Aktivität in den Kontrollzellen an. Die eingesetzte Konzentration von 2mM Butyrat entspricht hierbei der Konzentration, in der Butyrat natürlicherweise im Kolon vorliegt [79]. Bei der Koinkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat und 10 μ M Ciglitazon oder 10 μ M Rosiglitazon zeigten sich nun einige interessante Veränderungen. Beide Thiazolidindione hemmten die durch Butyrat induzierte LL-37 Expression sowohl nach 48h als auch nach 72h signifikant. Darüber hinaus lag die gemessene Aktivität der alkalischen Phosphatase in mit Butyrat und Ciglitazon oder Rosiglitazon koinkubierten Zellen ebenfalls bei weit weniger als der Hälfte der Aktivität, die in Zellen gemessen wurde, welche nur mit Butyrat behandelt wurden. Dieses Ergebnis deutet somit auch auf einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Differenzierung der Zellen und der LL-37 Expression hin. Trotzdem konnte in einer jüngst in unserem Labor durchgeführten Studie belegt werden, dass die Zelldifferenzierung von Kolonepithelzellen und die Expression von LL-37 über unterschiedliche intrazelluläre Signalwege reguliert wird, da sich nur die Wirkung auf die LL-37 Expression über spezifische Inhibitoren des MEK-ERK Signalwegs hemmen ließ [76]. Möglicherweise blockieren PPAR γ - Agonisten ebenfalls die MEK-ERK-Aktivität in Kolonzellen, was zu einer Blockierung der Butyrat- induzierten LL-37

Expression führen könnte. Welchen Einfluss PPAR γ - Agonisten auf andere, möglicherweise zellzyklusregulierende, intrazelluläre Signalwege in Kolonzellen haben, muss noch in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es unter Einwirkung von PPAR γ - Agonisten zu einer signifikanten Reduktion der LL-37 Expression kommt, sowohl mit als auch ohne Stimulation durch Butyrat. Dieses Ergebnis könnte durchaus zumindest einen Teil der entzündungshemmenden Wirkung von Thiazolidindionen erklären, da wie in der Einleitung schon erwähnt, eine zu hohe Konzentration von AMP auch schädlich für das Colonepithel sein kann und auch der Eingriff in die Modulation des spezifischen Immunsystems über eine niedrigere Konzentration von AMP erfolgen kann.

Modulation der LL-37 Expression in Abhängigkeit zur PPAR γ - Aktivität

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die gewonnenen Ergebnisse direkt PPAR γ vermittelt zustande kommen, wurde die LL-37 Expression in Abhängigkeit zur PPAR γ - Aktivität dargestellt. Hierbei wurde bei der Aufbereitung des Zellmaterials dieses in eine nukleäre Fraktion, in der die PPAR γ - Aktivität mittels Elisa bestimmt wurde, und eine cytosolische Fraktion, in der die LL-37 Expression mittels RT-PCR gemessen wurde, getrennt. Hierzu wurden neben den bisher schon eingesetzten Colonepithelzelllinien HT-29 und T-84 erstmals auch die Monozytenzelllinie U937 verwendet.

Auch bei diesen Versuchen wurde Butyrat als einer der bekannten Induktoren für LL-37 eingesetzt, was bei allen Zelllinien auch den erwarteten Effekt erzielte und es zu einer signifikanten LL-37-Expressionssteigerung kam. Hierbei fällt auf, dass die Expressionssteigerung mit einer bis zu 60-fachen LL-37 Induktion in den Colonepithelzelllinien sehr viel stärker ausfiel als in der Monozytenzelllinie in der eine 6-fache Induktion gemessen werden konnte. Diese Ergebnisse korrelieren jedoch nicht mit der im Kern bestimmten PPAR γ - Aktivität, da diese schon zwischen HT-29 und T-84 Zellen divergiert: In HT-29 Zellen kam es zu keiner signifikanten Änderung, in T-84 Zellen jedoch zu einer signifikanten Reduktion der PPAR γ - Aktivität. In den Monozyten fiel die Reduktion der PPAR γ - Aktivität noch deutlicher aus.

Von den weiterhin eingesetzten Thiazolidindionen Ciglitazone und Rosiglitazone war bei den Colonepithelzellen nach 72h nur in den mit Ciglitazone behandelten HT-29

Zellen ein signifikanter Anstieg der PPAR γ - Aktivität messbar. Wie in den Vorversuchen bereits dargestellt, kam es auch in dieser Versuchsreihe nach 72h Inkubation mit Ciglitazone zu keiner signifikanten Änderung der LL-37 Expression, da auch hier die Werte stark streuten. In den T-84 Zellversuchen kam es zu keiner signifikanten Modulation der PPAR γ - Aktivität durch Ciglitazone, jedoch analog zu den Vorversuchen zu einer signifikanten Reduktion der LL-37 Expression. Die Versuche mit der U937- Zelllinie zeigten, dass hier eine Behandlung mit Ciglitazone oder Rosiglitazone ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der LL-37 Expression führte, diese allerdings nur bei der Behandlung mit Rosiglitazone von einer signifikanten Minderung der PPAR γ - Aktivität begleitet wurde. Da es hierbei nach Inkubation mit Ciglitazone zu keiner signifikanten PPAR γ - Aktivität kommt, jedoch zur gleichen signifikanten Reduktion der LL-37 Expression, spricht auch dieses divergierende Ergebnis zwischen beiden Thiazolidindionen für einen PPAR γ unabhängigen Effekt.

Auch die Inkubation der Versuchszellen mit dem PPAR γ - Antagonisten BADGE ergab interessante Resultate. Zunächst konnten sowohl bei den Versuchen mit HT-29 Zellen als auch mit T-84 Zellen die signifikante LL-37 Expressionssteigerung aus den Vorversuchen bestätigt werden. Allerdings kam es zu keiner signifikanten Abnahme der PPAR γ - Aktivität. Beim gleichen Versuchsansatz mit U937 Zellen lässt sich nun jedoch eine signifikante Minderung der PPAR γ - Aktivität messen, die von einer ebenfalls signifikanten Reduktion der LL-37 Expression im Cytosol begleitet wird. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass einerseits eine signifikante Erhöhung der LL-37 Expression nicht zwangsläufig mit einer Modulation der PPAR γ - Aktivität einhergehen muss und andererseits die Effekte von BADGE, sowohl auf PPAR γ als auch auf LL-37, möglicherweise zellspezifische Unterschiede aufweisen.

Analog zu den Vorversuchen wurde auch eine Koinkubation mit PPAR γ - Agonisten- und Antagonisten vorgenommen. Hier kam es überraschender Weise bei mit BADGE und Ciglitazone inkubierten HT-29 Zellen zu einer nun signifikanten Reduktion der PPAR γ - Aktivität, ein Effekt, der auch bei mit BADGE und Rosiglitazon koinkubierten T-84 Zellen auftrat. Dies deutet darauf hin, dass BADGE einen PPAR γ - Agonisten benötigt, um die volle Wirkung als Antagonist für PPAR γ zu erhalten. Besonders interessant sind hierbei die Ergebnisse, die aus den Versuchen mit T-84 Zellen

gewonnen werden konnten: sowohl die Kombination von Ciglitazone mit BADGE als auch die Kombination Rosiglitazone mit BADGE führten zu einem signifikanten Anstieg der LL-37 Expression, jedoch kam es nur bei der Verwendung von Rosiglitazone zu einer Minderung der PPAR γ - Aktivität, während es unter der Einwirkung von Ciglitazone hier zu keiner Änderung kam. Dies ist wiederum ein Hinweis auf einen PPAR γ unabhängigen Effekt, insbesondere deshalb, da eine signifikante Reduktion der PPAR γ Aktivität in HT-29 Zellen auch zu keiner Änderung der LL-37 Expression führte. Der gleiche Effekt konnte auch in U-937 Zellen unter gleichen Versuchsbedingungen beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigt die Bestimmung der LL-37 Expression in Abhängigkeit zur PPAR γ - Aktivität keine eindeutige Korrelation der jeweiligen Effekte, so dass die Ergebnisse eher daraufhin deuten, dass die Modulation der LL-37 Expression durch PPAR γ - Modulatoren oder Butyrat nicht PPAR γ vermittelt zustande kommt.

Modulation der LL-37 Expression durch RXR-Agonisten

Wie in der Einleitung schon erläutert wurde, benötigen alle PPAR einen zweiten Rezeptor, um an die jeweilige Promotorregion der DNA binden zu können. Bei diesen handelt es sich wie bei PPAR gleichermaßen um Kernrezeptoren, welche aus der Gruppe der „retinoid X receptors“ (RXR) stammen. Da an RXR ebenfalls ein Ligand gebunden sein muss, damit dieser mit PPAR interagieren kann, könnten auch diese Liganden potentiell einen Einfluss auf PPAR γ - vermittelte Effekte nehmen. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich jedoch, dass Retinolsäure, welche als RXR-Agonist eingesetzt wurde, in einer Konzentration von 1 μ M keine signifikante Veränderung der LL-37 Werte bewirkte. Auch die gemessene Aktivität der alkalischen Phosphatase in Zellen, die mit 1 μ M Retinolsäure bis zu 72h inkubiert wurden, lag im Bereich der Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen. Diese Ergebnis unterstützt die These, dass RXR, welche den unterschiedlichsten Kernrezeptoren als Partner dienen, keine eigene regulatorische Funktion zukommt, sondern vielmehr im Inneren der Zelle im Überschuss vorhanden ist und möglicherweise eine reine Hilfsrolle bei der DNA Bindung übernimmt.

5. Zusammenfassung

Der menschliche Organismus muss sich permanent mit pathogenen und nicht pathogenen Krankheitserregern auseinandersetzen. Hierzu stehen ihm verschiedene Systeme der Immunabwehr zur Verfügung, zu denen auch antimikrobielle Peptide (AMP) gehören, deren Wirkungsspektrum sich von Bakterien über Pilze bis hin zu Viren erstreckt. Die AMP sind nicht nur in der Lage Krankheitserreger direkt abzutöten, sondern darüber hinaus auch konzentrationsabhängig modulierend auf das adaptive Immunsystem einzuwirken, wie zum Beispiel über chemotaktische Effekte auf Lymphozyten. Den AMP, von denen beim Menschen bisher 6α - und 4β Defensine sowie ein Cathelicidin (LL-37/hCAP-18) bekannt sind, kommt somit eine potentielle Schlüsselrolle in der Regulation der Immunabwehr zu. Bislang ist wenig über die Regulation der AMP bekannt, von denen einige konstitutiv expremiert werden, andere wiederum erst nach Stimulation, wie zum Beispiel Besiedlung mit bestimmten Keimen, vom jeweiligen Organ produziert und freigesetzt werden. Das Verständnis über die Wirkungsweise und die Regulation der AMP könnte möglicherweise der Klärung der Pathogenese von Erkrankungen dienen., bei denen eine bakterielle Mitbeteiligung nachgewiesen wurde, wie etwa den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Des Weiteren kommt den AMP aufgrund der komplexen Wirkung gegen Krankheitserreger auch eine potentielle therapeutische Rolle zu, welche auch in der vorliegenden Dissertation untersucht werden sollte. Hierzu wurden die Effekte von Liganden des peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) auf die Expression von LL-37 untersucht, da bei einigen dieser Liganden, insbesondere den aus der oralen Therapie des Diabetes mellitus Typ II bekannten Thiazolidindionen sowohl in der klinischen Beobachtung als auch im Tiermodell eine entzündungshemmende Wirkung nachgewiesen wurde. Die Gruppe der PPAR gehört zur Familie der Kernrezeptoren und wird in drei Subtypen α , β und γ unterteilt, wobei das größte Forschungsinteresse PPAR γ zukommt. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass Agonisten für PPAR γ , wie Ciglitazone oder Rosiglitazone, und auch Antagonisten, wie das eingesetzte BADGE, einen modulierenden Effekt auf die Expression von LL-37 in Colonicarcinomzelllinien und Prämonozyten haben. Es zeigte sich, dass es unter Einwirkung von PPAR γ - Agonisten zu einer signifikanten Reduktion der LL-37

Expression kam. Dieser Effekt konnte ebenfalls in der Koinkubation mit Butyrat, einer kurzkettigen Fettsäure, die einen bekannten Induktor für LL-37 darstellt, beobachtet werden, wobei die Butyrat- induzierte LL-37 Expression durch beide Thiazolidindione signifikant gehemmt wurde. Darüber hinaus wurde auch die durch Butyrat bedingte Steigerung der Differenzierungsrate der Versuchszellen durch PPAR γ - Agonisten signifikant reduziert. Analog zu diesen Ergebnissen führte der Einsatz von BADGE zu einer signifikanten Steigerung der LL-37 Expression, wobei dieses Ergebnis mit einem anderen PPAR γ - Antagonisten nicht bestätigt werden konnte und somit auch eine BADGE spezifische Wirkung darstellen könnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Modulation der LL-37 Expression nicht eindeutig mit der PPAR γ - Aktivität im Zellkern der Versuchszellen korreliert, was somit eher dafür spricht, dass der modulierende Effekt von PPAR γ - Liganden auf die LL-37 Expression über einen von PPAR γ unabhängigen Signalweg zustande kommt. Zusammenfassend hemmen die Thiazolidindione jedoch die LL-37 Expression in vitro, was eine entzündungshemmende Wirkung dieser Medikamente vermitteln könnte, da es über die Konzentrationsänderung von LL-37 zu einem Eingriff in die Modulation des spezifischen Immunsystems kommen kann. Um eine sichere Aussage darüber treffen zu können, ob die beobachtete antiinflammatorische Wirkung der Thiazolidindione über eine Expressionsänderung der AMP zustande kommt, müssen weiterführende Studien durchgeführt werden.

6. Verwendete Abkürzungen

AMP: Antimikrobielle Peptide

AP: Alkalische Phosphatase

BADGE: Bisphenol A diglycidyl ether

But: Butyrat

Cig: Ciglitazon

CF: Cystische Fibrose

FACS: Fluorescence activated cell sorter

HBD: human β - defensin

HD: human defensin

HND: human α - defensin

HRE: hormone responsive element

LPS: Lipopolysacharide

MAP: mitogen-activated protein

ml: Millilitre

mM: mill molar

mU: milli-Units

NF κ B: nuclear factor κ B

PGJ₂: 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors

PPRE: peroxisome proliferator response elements

Rosi: Rosiglitazon

rpm: rounds per minute

RXR: retinoid-X-receptor

TLR-4: toll like receptor- 4

TNF α : Tumornekrosefaktor α

7. Literaturverzeichnis

1. Harder, J., et al., *A peptide antibiotic from human skin*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 861.
2. Gudmundsson, G.H., et al., *The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes*. Eur J Biochem, 1996. **238**(2): p. 325-32.
3. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides in health and disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(15): p. 1199-200.
4. Boman, H.G., *Innate immunity and the normal microflora*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 5-16.
5. Hancock, R., *Peptide antibiotics*. Lancet, 1997(349): p. 412-22.
6. Lohner, K., et al., *Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems*. Biochemistry, 1997. **36**(6): p. 1525-31.
7. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 710-20.
8. Agerberth, B., et al., *Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides*. Eur J Biochem, 1991. **202**(3): p. 849-54.
9. Shi, J., et al., *PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 6014-8.
10. Shafer, W.M., et al., *Modulation of Neisseria gonorrhoeae susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1829-33.
11. Lysenko, E.S., et al., *Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1664-71.
12. Ganz, T. and R.I. Lehrer, *Defensins*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(4): p. 584-9.
13. Bals, R., *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*. Respir Res, 2000. **1**(3): p. 141-50.
14. Termen, S., et al., *Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(3): p. 536-49.
15. Yang, D., O. Chertov, and J.J. Oppenheim, *Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37)*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(5): p. 691-7.
16. Selsted, M.E., et al., *Primary structures of three human neutrophil defensins*. J Clin Invest, 1985. **76**: p. 1436-1439.
17. Ganz, T., et al., *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. **76**: p. 1427-1435.
18. Quayle, A., et al., *Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract*. Am J Pathol, 1998. **152**: p. 1247-1258.

19. Valore, E., et al., *Human betha-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues*. J Clin Invest, 1998. **101**: p. 1633-1642.
20. McCray, P.J. and L. Bentley, *Human airway epithelia express a betha-defensin*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**: p. 343-349.
21. Duits, L.A., et al., *Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells*. Immunology, 2002. **106**(4): p. 517-25.
22. Lehrer, R., T. Ganz, and M. Selsted, *Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells*. Cell, 1991. **64**: p. 229-230.
23. Lizmeier, R., et al., *A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23*. Gene, 1999. **233**: p. 205-211.
24. Agerberth, B., et al., *The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3086-93.
25. Agerberth, B., et al., *FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(1): p. 195-9.
26. Cowland, J.B., A.H. Johnsen, and N. Borregaard, *hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules*. FEBS Lett, 1995. **368**(1): p. 173-6.
27. Frohm Nilsson, M., et al., *The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2561-6.
28. Frohm, M., et al., *The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders*. J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15258-63.
29. Bals, R., et al., *Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide*. Infect Immun, 1999. **67**: p. 6084-6089.
30. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science, 1996. **272**(5258): p. 50-3.
31. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
32. Singh, P., et al., *Production of betha-defensins by human airway epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**: p. 14961-14966.
33. O'Neil, D.A., et al., *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6718-24.
34. Frohm, M., et al., *The expression or the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 15258-15263.
35. Islam, D., et al., *Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 180-5.
36. Nizet, V., et al., *Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection*. Nature, 2001. **414**(6862): p. 454-7.
37. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. Science, 1999. **286**(5437): p. 113-7.

38. Porter, E.M., et al., *The multifaceted Paneth cell*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(1): p. 156-70.
39. Ong, P.Y., et al., *Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis*. N Engl J Med, 2002. **347**(15): p. 1151-60.
40. Putsep, K., et al., *Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study*. Lancet, 2002. **360**(9340): p. 1144-9.
41. Johansson, J., et al., *Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3718-24.
42. Cunliffe, R., F. Rose, and e. al, *Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease*. Gut, 2001. **48**: p. 176-185.
43. Wehkamp, J. and e. al, *Inducible and constitutive beta-Defensins are differentially expressed in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*. Inflammatory Bowel Diseases, 2003. **9**: p. 215-223.
44. Mangelsdorf, D., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**: p. 835-839.
45. Juge-Aubry, C., et al., *DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25252-9.
46. Desvergne, B. and W. Wahli, *Inducible Gene Expression*. Baeuerle, P.A., ed, 1995. **1**: p. 142-176.
47. Fajas, L., J.C. Fruchart, and J. Auwerx, *PPARgamma3mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter*. FEBS Lett, 1998. **438**: p. 55-60.
48. Dubuquoy, L., et al., *Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases*. Lancet, 2002. **360**(9343): p. 1410-8.
49. Dubuquoy, L., et al., *Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1265-76.
50. Wächtershäuser, A., S. Loitsch, and J. Stein, *PPARgamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **272**: p. 380-385.
51. Saladin, R., et al., *Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 mRNA expression in early stages of adipogenesis*. Cell Growth Differ, 1999. **10**: p. 43-48.
52. Chambon, P., *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*. Faseb, 1996. **10**: p. 940-954.
53. Wang, Q., et al., *Expression of PPAR, RXR isoforms and fatty acid transporting proteins in the rat and human gastrointestinal tracts*. J Pharm Sci, 2005. **94**(2): p. 363-72.
54. Kliewer, S.A., et al., *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From Genes to Physiology*. The Endocrine Society, 2001: p. 239-263.
55. Brown, K.K. and e. al, *Diabetes*, 1999. **48**: p. 1415-1424.
56. Bastie, C.D., et al., *J Biol Chem*, 1999. **274**: p. 21920-21925.

57. He, T., et al., *PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Cell, 1999. **99**: p. 335-345.
58. Kliewer, S.A., et al., *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. Cell, 1995. **83**(5): p. 813-9.
59. Lehmann, J.M., et al., *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12953-6.
60. Schwartz, S., et al., *Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. Troglitazone and Exogenous Insulin Study Group*. N Engl J Med, 1998. **338**(13): p. 861-6.
61. Debril, M.B., et al., *The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Mol Med, 2001. **79**(1): p. 30-47.
62. Ren, D., et al., *PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis*. Genes & Development, 2002. **16**: p. 27-32.
63. Desreumaux, P., et al., *Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies*. J Exp Med, 2001. **193**: p. 827-838.
64. Su, C.G., et al., *A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response*. J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 383-9.
65. Marx, N., F. Mach, and A. Sauty, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells*. J Immunol, 2000. **164**: p. 6503-6508.
66. Jiang, C., A.T. Ting, and B. Seed, *PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 82-6.
67. Rossi, A., et al., *Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase*. Nature, 2000. **403**: p. 103-108.
68. Doi, H., et al., *Downregulation of TGFbeta isoforms and their receptors contributes to keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris*. J Dermatol Sci, 2003. **33**(1): p. 7-16.
69. Kuenzli, S. and J.H. Saurat, *Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology*. Br J Dermatol, 2003. **149**(2): p. 229-36.
70. Pershadsingh, H.A., et al., *Treatment of psoriasis with troglitazone therapy*. Arch Dermatol, 1998. **134**(10): p. 1304-5.
71. Ellis, C.N., et al., *Troglitazone improves psoriasis and normalizes models of proliferative skin disease: ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibit keratinocyte proliferation*. Arch Dermatol, 2000. **136**(5): p. 609-16.
72. Gustafsson, B.E., *The physiological importance of the colonic microflora*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1982. **77**: p. 117-31.
73. O'Neil, D.A., et al., *Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with Helicobacter pylori or stimulation with interleukin-1*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5412-5.

74. Bassaganya-Riera, J., et al., *Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression*. J Nutr, 2003. **133**(10): p. 3204-14.
75. Fehlberg, S., et al., *Bisphenol A diglycidyl ether-induced apoptosis involves Bax/Bid-dependent mitochondrial release of apoptosis-inducing factor (AIF), cytochrome c and Smac/DIABLO*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(3): p. 495-500.
76. Schaubert, J., et al., *Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways*. Gut, 2003. **52**(5): p. 735-41.
77. Scheppach, W., *Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function*. Gut, 1994. **35**(1 Suppl): p. S35-8.
78. Hase, K., et al., *Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 953-63.
79. Cummings, J.H., *Short chain fatty acids in the human colon*. Gut, 1981. **22**(9): p. 763-79.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, insbesondere gilt mein Dank

Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach für die Möglichkeit dieses Thema zu bearbeiten und die Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Herrn Professor Dr. med. D. Meyer für die freundliche Übernahme des Korreferates.

für die geduldige Betreuung und Anregungen im praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit meinem Betreuer Dr. med. Jürgen Schauber, sowie Dr. rer. nat. Frank Weiler und Dr. med. Theo Kudlich.

dem Team des Gastrolabors - Gerda Dusel, Elisabeth Kelber, Kerstin Backhaus und Donata Kuhn - gilt mein besonderer Dank für technische und moralische Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

- Name Schröder
- Vorname Dominic
- Geburtsdatum 23.02.1977
- Geburtsort Geldern

Schulbildung

- 1983-1987 Grundschule Werbach / Wenkheim
- 1987-1993 Realschule Tauberbischofsheim
- 1993-1996 Wirtschaftsgymnasium Tauberbischofsheim

Zivildienst

- 1996-1997 Universitätsklinik Würzburg

Berufstätigkeit

- 1997-1999 Vollzeitätigkeit in einem Spenglereibetrieb

Hochschulausbildung

- SS 1999 - WS 2005 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- März 2001 Ärztliche Vorprüfung
- März 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- August 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- November 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

- Innere Medizin Medizinische Klinik Würzburg
- Chirurgie LKH Klinikum Coburg
- Pädiatrie Universitäts-Kinderklinik Würzburg

Dominic Schröder