

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

**Histondeazetylase-Inhibitoren induzieren die Expression
des antimikrobiellen Cathelizidins LL-37 in Hepatozyten
und in Epithelzellen des Magens und Kolons**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Susanne Frisch
aus Würzburg

Würzburg, April 2007

Referent : Prof. Dr. med. Wolfgang Scheppach

Korreferent : PD Dr. med. Bertram Illert

Dekan : Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung : 4. April 2007

Die Promovendin ist Ärztin.

MEINEN ELTERN

1. Einleitung	1
1.1. Barrierefunktion im Gastrointestinaltrakt	1
1.2. Antimikrobielle Peptide	3
1.3. Histon-Deazetylase-Inhibitoren und Signalwege	9
1.3.1. Butyrat	9
1.3.2. Histon-Deazetylasehemmung	10
1.3.3. Signalwege	12
1.4. Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Verwendete Zellen und Zellkulturexperimente	15
2.1.2. Analyse der Signalwege	16
2.2. Methoden	16
2.2.1. RNA-Extraktion	16
2.2.2. RNA-Aufreinigung und die RNase-free DNase Behandlung	17
2.2.3. cDNA-Synthese	17
2.2.4. Real-Time RT-PCR	18
2.2.5. Western-Blot	21
2.2.5.1. Protein-Aufbereitung für LL-37 Western-Blot	21
2.2.5.2. Protein-Konzentrationsmessung	21
2.2.5.3. Western-Protokoll LL-37	21
2.2.5.4. Elektrophorese	22
2.2.5.5. Blotting	22
2.2.5.6. Färbung	23
2.2.6. Immunhistochemie	24
2.3. Statistische Analysen	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Das Cathelizidin LL-37 wird von humanen Kolon-, Magen- und hepatozellulären Karzinomzellen nicht exprimiert	26
3.2. Histon-Deazetylase-Inhibitoren induzieren die Expression von LL-37 in Kolonepithelzellen, Hepatozyten und Magenepithelzellen	27
3.2.1. HT-29 Inkubation mit Butyrat	28
3.2.2. HT-29 Inkubation mit Trichostatin	29
3.2.3. HepG2 Inkubation mit Butyrat	29

3.2.4.	HepG2 Inkubation mit Trichostatin	30
3.2.5.	23132/87-Zellen Inkubation mit Butyrat	31
3.2.6.	23132/87-Zellen Inkubation mit Trichostatin	32
3.3.	Histon-Deazetylase-Inhibitoren modulieren Histon- und Nichthiston-Proteine in den untersuchten Kolonepithel-, Magen- und hepatozellulären Zelllinien	32
3.3.1.	HDAC-Effekt auf Histon- und Nichthiston-Proteine in HT-29-Zellen	33
3.3.2.	HDAC-Effekt auf Histon- und Nichthiston-Proteine in HepG2-Zellen	34
3.3.3.	HDAC-Effekt auf Histon- und Nichthiston-Proteine in SC-1-Zellen	34
3.4.	Der Einfluss des MEK-ERK-Signalweges auf die HDAC induzierte LL-37 Expression in Kolon-, Magen- und hepatozellulären Karzinomzellen	35
3.4.1.	Einfluss des MEK-ERK-Signalweges auf die LL-37 Genexpression in HT-29-Kolonzellen	36
3.4.2.	Einfluss des MEK-ERK-Signalweges auf die LL-37 Genexpression in 23132/87-Magenzellen	37
3.4.3.	Einfluss des MEK-ERK-Signalweges auf die LL-37 Genexpression in HepG2-Leberzellen	38
4.	<i>Diskussion</i>	39
4.1.	Expression und Funktion des antimikrobiellen Peptids LL-37	40
4.2.	Modulation und Regulation des antimikrobiellen Peptids LL-37 durch Butyrat und TSA	42
4.3.	Der Effekt von Butyrat und TSA auf die Modulation von Histon- und Nichthiston- Proteinen in HT-29-, HepG2- und 23132/87-Zellen	45
4.4.	Die Rolle des MEK-ERK-Signalweges	47
5.	<i>Zusammenfassung</i>	49
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	52
7.	<i>Danksagung</i>	69
8.	<i>Curriculum Vitae</i>	70

1. Einleitung

1.1. Barrierefunktion im Gastrointestinaltrakt

Der menschliche Organismus ist ständig einer Vielzahl von endogenen und exogenen Noxen ausgesetzt. Trotzdem gelingt es dem menschlichen Organismus, einen Großteil davon, durch teilweise erforschte, aber auch weitgehend unverstandene Schutzmechanismen, erfolgreich abzuwehren. Viele pathogene Krankheitserreger, wie Bakterien, Viren und Pilze, gelangen über Schleimhautoberflächen in den Wirtsorganismus. Beim Menschen stellt der Gastrointestinaltrakt eine der größten zusammenhängenden Schleimhautoberflächen dar. Tatsächlich beläuft sich die gesamte Schleimhautoberfläche auf ca. 400 m², die dem dauernden Kontakt mit ca. 500 verschiedenen Bakterienspezies ausgesetzt ist. Ein Großteil hier von befindet sich im Dickdarm, wo Bakterienzahlen von bis zu 10¹¹ oder 10¹² Zellen/g Stuhlmasse vorkommen können (Simhon, Douglas, et.al. 1982).

Der Gastrointestinaltrakt hat als Oberfläche zwischen Organismus und Umwelt zwei wichtige Funktionen: Als Verdauungsorgan erlaubt er die Ingestion lebenswichtiger Nährstoffe aus dem intestinalen Lumen, als Barriere verhindert er das Eindringen potentiell gefährlicher Faktoren wie zum Beispiel Mikroorganismen, luminale Antigene oder luminale proinflammatorischer Faktoren. Die intestinale Permeabilität wird durch verschiedene Barrierekomponenten, wie die Kolonflora, die Muzinschicht, das Oberflächenepithel und das „gut-associated-lymphoid-tissue“ (GALT), bestimmt.

Die residente Mikroflora ist in ihrer Zusammensetzung unter konstanten Lebensbedingungen in einem Organismus weitestgehend stabil. Jeder Abschnitt des Gastrointestinaltrakts hat eine bestimmte Zusammensetzung von Bakterien, die für ihn charakteristisch ist. Hinsichtlich der Prävention eindringender Pathogene ist die Relevanz der Mikroflora bereits seit längerem bekannt. So wurde beispielsweise beobachtet, dass keimfrei gezüchtete Tiere weit anfälliger für Infektionen sind (Baba, Nagaishi, et al. 1991; Taguchi, Takahashi, et. al. 2002). Verschiedene Mechanismen spielen hierbei eine Rolle. Bakterien konkurrieren um Bindungsstellen im Bürstensaum der intestinalen Epithelzellen (Bernet, Brassart, et. al. 1994). Adhärente, nicht pathogene Bakterien

können auf diese Weise die Bindung und die Invasion pathogener Bakterien verhindern. Weiterhin konkurrieren die Bakterien um das vorhandene Nahrungsangebot in ökologischen Nischen.

Die erwähnte Muzinschicht des Darmes ist 100 - 400 μm , die des Magens 600 μm dick. Sie überzieht als visköses Gel die Epitheloberfläche und schützt auf diese Weise vor mechanischen und chemischen Schäden. Sie besteht hauptsächlich aus Wasser und zahlreichen Glykoproteinen (Muzine). Zusätzlich beinhaltet die Schicht aber auch noch Immunglobuline und antimikrobielle Peptide, auf die in Abschnitt 1.2. noch ausführlich eingegangen wird. Viele Mikroorganismen und enterale Pathogene binden an die Muzinschicht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass bei der Interaktion Bakterium-Epithel Muzin-Bindungsstellen mit denen des darunter liegenden Epithels konkurrieren und so ein kompetitiver Hemmmechanismus zur Protektion des Epithels vor pathogenen Mikroorganismen entsteht (Moncada, Kammanadiminti, et. al. 2003; Matsuo et. al. 1997). Weiterhin konnten zwei verschiedene Muzinschichten identifiziert werden, wobei die interne Schicht dem Epithel adhärent ist (Moncada, Kammanadiminti, et. al. 2003). Interessanterweise werden im gesunden Epithel nur an der externen Schicht Bakterien und luminale Inhalte beobachtet. Desweiteren wurde in mehreren Studien die Inhibition der Invasion pathogener Organismen (z. B. *Entamoeba histolytica*) durch die Muzinschicht sowie die gesteigerte Muzinsekretion als Antwort auf eingewanderte Pathogene demonstriert (Darcy, Moncada, et. al. 2003).

Das Oberflächenepithel des Gastrointestinaltraktes stellt zusammen mit der Muzinschicht die Mukosabarriere dar. Sie zeichnet sich durch eine hohe Selektivität hinsichtlich der Molekülgröße und physiochemikalischen Eigenschaften aus. Die Permeation des Epithels geschieht auf zwei Hauptwegen: transzellulär oder parazellulär. Zweiteres wird hauptsächlich durch Tight Junctions kontrolliert, die eine Schlüsselstellung hinsichtlich der Durchlässigkeit für Makromoleküle, wie z. B. Endotoxine oder andere Bakterienprodukte, einnehmen. Ein weiterer wichtiger Bestandteil für die Integrität der Epithelzellen und der parazellulären Permeabilität ist das Zytoskelett. Es besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten und ist unerlässlich für die Aufrechterhaltung einer normalen Struktur, Transportfähigkeit und Funktionalität aller eukaryotischen Zellen (Alvila 1987; Banan, Smith, et. al. 1988). So kann eine Zerstörung der Mikrotubuli, beispielsweise durch Colchicin, zu einer stark

verminderten Zellfunktion und Integrität der intestinalen Barriere führen (Alvila 1987; Banan, Smith, et. al. 1988).

Als weiterer Faktor spielt das Immunsystem des Gastrointestinaltrakts, das GALT, eine nicht unwesentliche Rolle in der Abwehr von potentiell pathogenen Noxen. Hierzu gehören die Tonsillen und das lymphatische Gewebe der Mundregion, die Payerschen Plaques im Duodenum und Ileum, die mesenterialen Lymphknoten, der Appendix und B-Zell Solitärfoellikel im Kolon (Brankdtzaeg, Baekkevold, et. al. 1999). Im gesamten Epithel verstreute, sogenannte M-Zellen induzieren die Immunantwort im Darm. Sie leiten aufgenommene Antigene über antigenpräsentierende Zellen (z. B. dendritische Zellen) in sog. Peyerschen Plaques, wo sie den T- und B-Zellen präsentiert werden (Mowat 2003). Aktivierte T- und B-Zellen verlassen den Lymphknoten über die abgegebene Lymphe und gelangen über den Pfortaderkreislauf in die mukosale Lamina Propria und als intraepitheliale Lymphozyten zwischen die Epithelzellen. Die Lamina Propria stellt durch die von Plasmazellen sezernierten IgA Antikörper und die von ihr beinhaltenen Makrophagen, dendritischen Zellen, Neutrophilen und Mastzellen ein wichtiges Element der intestinalen Barriere dar. IgA Antikörper, die von Plasmazellen der Mukosa sezerniert werden, binden, immobilisieren und neutralisieren Antigene, bevor sie in den Organismus eindringen können. Mit ihrem weiten Spektrum, das sich von Viren über Bakterien, Parasiten und Toxinen bis zu Nahrungsmittelallergenen erstreckt, stellen auch sie einen wesentlichen Teil der unspezifischen Immunabwehr dar (Wittig, Zeitig 2003).

1.2. Antimikrobielle Peptide

Zusätzlich zu den oben genannten Faktoren der intestinalen Mukosabarriere sezernieren Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes antimikrobielle Peptide ins Lumen. Antimikrobielle Peptide sind Effektor-moleküle des angeborenen Immunsystems (Boman 2003). Hier findet man sie in vielen Organismen, einschließlich Pflanzen, Insekten, Bakterien und Wirbeltieren (Lehrer, Ganz, et. al. 1999; Boman 1998; Zanetti, Gennaro, et. al. 1997). Bis heute sind über 700 verschiedene antimikrobielle Peptide identifiziert (Hoffmann, Kafatos, et.al. 1999; Boman 2003), die man in zwei Hauptklassen unterteilt: Defensine und Cathelizidine. Bei den Defensinen

unterscheidet man aufgrund ihrer Sekundärstruktur α - und β -Defensine (Zasloff, 2002). Cathelizidine und Defensine haben die Kapazität, Bakterien, Pilze und bestimmte Viren zu inaktivieren oder abzutöten. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Cathelizidinen. Der Name Cathelizidin wurde geprägt, um eine Klasse von Peptiden mit einer ähnlichen „Cathelin“-Vorläufer-Domäne zusammenzufassen. Sie sind durch ein N-terminales Signalpeptid, eine hochkonservierte Prosequenz und ein strukturell variables, reifes Peptid am C-terminalen Ende charakterisiert (Zanetti, Gennaro, et. al. 2000). Im Verlauf der Evolution haben sich signifikante Veränderungen nur an der C-terminalen, antimikrobiell wirksamen Domäne abgepielt, was eine Divergenz der reifen Proteinsequenzen und, damit verbunden, eine Variabilität der biologischen Funktion zur Folge hatte. Bisher sind Cathelizidine nur in Säugetieren identifiziert worden. So hat man sie beispielsweise bei Hasen (Larrick, Morgan, et. al. 1991), Schweinen (Storici, Scocchi, et. al. 1994; Bals, Lang, et. al. 2001), Kühen (Zanetti, Del Sal, et. al. 1993), Schafen (Bagella, Scocchi, et. al. 1995), Pferden (Scocchi, Bontempo, et. al. 1999), Mäusen (Gallo, Kim, et. al. 1997), Ziegen (Shamova, Brogden, et. al. 1999), Ratten (Travis, Anderson, et. al. 2000), Meerschweinchen (Nagaoka, Tsutsumi-Ishii, et. al. 1997), Affen (Bals, Lang, et. al. 2001) und dem Menschen (Agerberth, Gunne, et. al. 1995) nachgewiesen. Aufgrund ihrer biochemischen Charakteristika unterscheiden sich die reifen Cathelizidine. Hinsichtlich ihrer C-terminalen Domäne sind Cathelizidine die strukturell am abwechslungsreichsten antimikrobiellen Peptide. So findet man reife Cathelizidine, die durch ihren hohen Gehalt einer oder zwei Aminosäuren (oftmals Prolin oder Arginin) charakterisiert sind. Andere sind reich an α -helikalen, zysteinfreien Peptiden oder bilden über drei Disulfidbrücken eine β -Faltblattstruktur aus (Dorschner, Pestonjamas, et. al. 2001).

Bisher ist nur ein einziges humanes Cathelizidin, genannt nach seiner C-terminalen Peptidsequenz LL-37, bekannt. Das aus 37 Aminosäuren bestehende Peptid beginnt mit zwei Leucin-Resten, was die Namensgebung erklärt. LL-37 hat eine positive Ladung (+6), ein stark hydrophobes N-terminales Ende (Agerberth, Gunne, et. al. 1995) und gehört zu der Gruppe der α -helikalen Cathelizidine. Das für LL-37 codierende Gen (CAMP $\hat{=}$ Cathelizidin antimikrobielles Peptid) liegt auf Chromosom 3 (Gudmundsson, Magnusson, et. al. 1995). Wie andere Cathelizidine wird auch LL-37 als Vorläufer, hCAP18 (human cationic antimicrobial peptide 18), synthetisiert. Es ist bekannt, dass das in den sekundären Granula

neutrophiler Granulozyten gelagerte hCAP18 nach Stimulation durch Exozytose entlassen wird. Durch die anschließende Spaltung des Peptids zwischen Ala 103 und Leu 104 (Gudmundsson, Agerberth, et. al. 1996) entsteht hieraus, mit Hilfe der Serin Protease 3, das reife LL-37 Peptid (Sorensen, Follin, et.al. 2001). LL-37 wird in Neutrophilen und Lymphozythen exprimiert (Cowland, Johnsen, et. al. 1995; Agerberth, Charo, et. al. 2000). Zusätzlich wird es im Knochenmark (Agerberth, Gunne, et. al. 1995), den Keratinozyten entzündeter Haut (Frohm, Agerberth, et. al. 1997), dem Lungenepithel (Bals, Wang, et. al. 1998) sowie den Plattenepithelien des Mundes, der Zunge, des Ösophagus, der Zervix und der Vagina synthetisiert (Frohm, Sandstedt, et. al. 1999). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass auch differenzierte Zellen des menschlichen distalen Dünndarms sowie des Kolons LL-37 exprimieren (Schauber, Svanholm, et. al. 2003). Neuere Studien haben sogar die Anwesenheit von LL-37 in Amnionflüssigkeit und Vernix belegt (Yoshio, Tollin, et. al. 2003). Aufgrund dieses Expressionsmusters scheint das Peptid eine wichtige Komponente sowohl des phagozytären als auch des epithelialen Abwehrsystems darzustellen (Schauber, Svanholm, et. al. 2003; Gudmundsson, Agerberth, et. al. 1996; Johansson, Gudmundsson, et. al. 1998). LL-37 alleine und in Kombination mit anderen antimikrobiellen Peptiden, wie es in vivo die Regel ist, hat ein weites antimikrobielles Spektrum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Agerberth, Gunne, et. al. 1995; Bals, Wang, et. al. 1998; Travis, Anderson, et. al. 2000). Dabei zeigen aufgereinigtes und chemisch synthetisiertes LL-37 sowie der Cathelizidin Vorläufer eine potente und vergleichbare antimikrobielle Wirkung in vitro (Gudmundsson, Agerberth, et. al. 1996; Johansson, Gudmundsson, et. al. 1998). Weiterhin hat das Peptid die Fähigkeit, bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) zu binden und zu neutralisieren (Ayabe, Satchell, et.al. 2000; Larrick, Hirata, et. al. 1995). Eine weitere wesentliche Eigenschaft ist die chemotaktische Wirkung von LL-37 auf humane Monozyten, Neutrophile, CD4 T-Lymphozyten und Mastzellen (Agerberth, Charo, et. al. 2000; De, Chen, et. al. 2000; Niyonsabe, Iwabuchi, et. al. 2002). Die chemotaktische Wirkung wird für Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten über den Formly Peptide Rezeptor-Like1 (FPRL1) und eine nachfolgende G-Protein-Signalkaskade vermittelt (*Abb. 1*).

Abb. 1

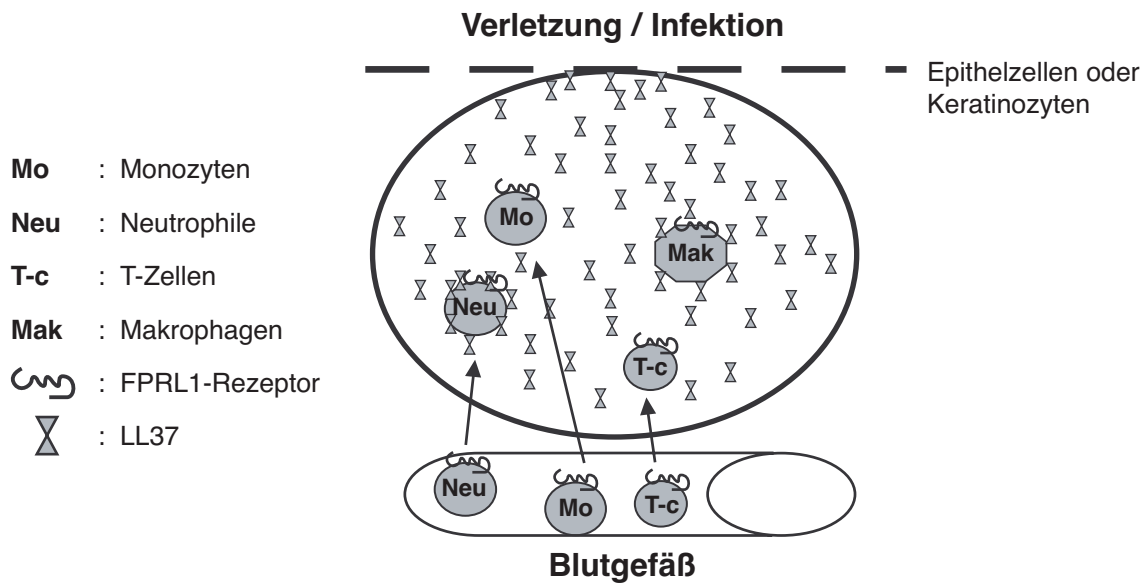


Abb.1. Schematische Darstellung der Rolle von LL-37 in angeborener und erworbener Immunität: Durch mikrobielle Invasion wird die LL-37 Produktion in Epithelzellen/ Keratinozyten und Gewebsmakrophagen (Mak) induziert. Unter anderem formen Cathelicidine einen Gradienten, der zusammen mit anderen chemotaktischen Mediatoren die Extravasation verschiedener Leukozyten veranlasst. Chemotaktisch rekrutierte Neutrophile (Neu) entlassen wiederum LL-37, was die Rekrutierung weiterer Leukozyten bewirkt. Die ebenfalls chemotaktisch angelockten Monozyten sind zusammen mit den Neutrophilen Teil des angeborenen Immunsystems, die rekrutierten T-Zellen binden das erworbene Immunsystem mit ein.

Im Unterschied dazu scheint die chemotaktische Wirkung auf Mastzellen nicht über diesen Rezeptor, jedoch über eine G-Protein-Kaskade, vermittelt zu werden (Niyonsabe, Iwabuchi, et. al. 2002). Neuere Studien konnten außerdem eine Rolle von LL-37 in der für Abwehr und Wundheilung essentiellen Angiogenese postulieren. Hierbei ist wiederum FPRL1 der wahrscheinlich entscheidende Rezeptor (Koczulla, v. Degenfeld, et. al. 2003). Rezeptoren, welche die Anwesenheit von Mikroben, beschädigtem Gewebe, oder proinflammatorische Zytokine erkennen und nachfolgend die Expression der für die antimikrobiellen Peptide codierenden Gene induzieren, sind ebenfalls erst vor kurzem für die Familie der Defensine identifiziert worden. Die am besten charakterisierte Gruppe dieser Rezeptoren ist die Familie der Toll-Like-Rezeptoren (TLR) (Akira, Takeda, et. al. 2001). Sie sind auf Epitheloberflächen oder zirkulierenden Zellen, die zur Frontlinie der Abwehr gehören, exprimiert. Mindestens

10 verschiedene TLRs wurden im humanen Organismus identifiziert. Jeder von ihnen scheint ein unterschiedliches Merkmal mikrobieller Organismen, die ein pathologisches Pattern repräsentieren, zu erkennen (Zasloff, N. Engl. J. Med. 2002). Der Mechanismus, der anschließend zur Elimination potenziell pathogener Organismen führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die bakterielle Membran scheint allerdings der Hauptangriffspunkt antimikrobieller Peptide zu sein. Die Unterscheidung zwischen eukaryotischen und bakteriellen Zellen findet über Variationen in der Zusammensetzung der Zellmembran statt (Zasloff, Nature 2002). Im Falle der eukaryotischen Zellen ist der Hauptbestandteil der Membran Cholesterin. Es überwiegen bei den Lipiden Phosphatidylcholine (PC), und sie haben eine fast neutrale äußere Membran. Bakterienzellen fehlt das Cholesterin, das dominante Lipid ist Phosphatidylethanolamin (PE), und ihre äußere Membran besteht aus 20 - 25 % negativ geladener Lipide (Henzler Wildman, Lee, et. al. 2003). Nachdem die Mehrheit der α -helikalen antimikrobiellen Peptide, und somit auch LL-37, positiv geladen sind, ist die am weitesten verbreitete Theorie zur Erklärung der Selektivität die elektrostatische Anziehungskraft zwischen den kationischen Peptiden und den anionischen Bakterienmembranen. Desweiteren wird die Aktivität antimikrobieller Peptide durch die Anwesenheit von Cholesterin generell reduziert (Matsuzaki, 1999). Der genauere Mechanismus, der zur Zerstörung der bakteriellen Membran durch LL-37 führt, wird in neueren Studien erforscht (Henzler Wildman, Lee, et. al. 2003). Fest steht, dass schließlich Porenbildung die zugrunde liegende Ursache der Membranzerstörung ist (Henzler Wildman, Lee, et. al. 2003). Am wahrscheinlichsten erscheint das Modell der Toroidal-Pore-Bildung (Henzler Wildman, Lee, et. al. 2003). LL-37 aggregiert in hohen Konzentrationen parallel zur Membranoberfläche, induziert positive Kurvenspannung in der Membran und formt eine transiente Peptid-Lipid-Pore. LL-37 scheint so die Lipidmembran zu spalten (Henzler Wildman, Lee, et. al. 2003).

Verschiedenste Erkrankungen des Menschen und von Labortieren sind durch eine Beeinträchtigung antimikrobieller Peptide gekennzeichnet (Zasloff, Nature 2002). So ist bekannt, dass die Anwesenheit von LL-37 einen Endotoxinschock in Mäusen verhindern kann (Kirikae, Hirata, et. al. 1998). In einem anderen Modell wurde ein mit LL-37 beladener Adenovirus in ein Xenograftmodell von Atemwegsepithelien cystischer Fibrose-Patienten transferiert. Der damit verbundene Anstieg von LL-37 war ausreichend, um die Problemkeime *P. aeruginosa* und *Staph. aureus* dieser Versuchstiere auf einen normalen Level zu bringen (Bals, Weiner, et. al.

1999). LL-37 wurde weiterhin in Wund- und Blasenflüssigkeit gefunden (Frohm, Gunne et. al. 1996). Zusätzlich steigt die Expression in der Epidermis, sowie in der Wunde selbst, kurz nach einer Hautverletzung stark an (Dorschner, Pestonjamasp, et. al. 2001). Weiterhin wurde beobachtet, dass bei pathologischen Konditionen in der Epidermis, wie zum Beispiel der Psoriasis, dem Lupus Erythematoses und der Nickelallergie die Genexpression für LL-37 stark erhöht ist (Frohm, Agerberth, et. al. 1997). Im Gegensatz dazu ist sie bei atopischer Dermatitis drastisch gesenkt, was die rezidivierende Infektionen erklärt (Ong, Ohtake, et. al. 2002). Das LL-37-Pendant von Mäusen, CRAMP, zeigte bei einem Knockout-Versuch eine Überempfindlichkeit der defizienten Mäuse für eine *A-Streptokokken*-Infektion. Außerdem wurde bei einer Infektion, die normalerweise nur eine mild verlaufende, selbstlimitierende Reaktion hervorruft, eine stark destruktive, nekrotisierende Ulzeration beobachtet (Nitzet, et. al. 2001). Sehr interessante Ergebnisse liefert auch eine Studie über den möglichen therapeutischen Einsatz von LL-37 bei neutropenischen Mb. Kostmann Patienten. Eine deutliche Reduktion oder gar Defizienz in den Neutrophilen, dem Plasma und dem Speichel der Patienten konnte nachgewiesen werden. Ein knochenmarkstransplantiertes Patient hingegen zeigte fast normale Konzentrationen des Peptids. Auch die schweren paradontitischen Erkrankungen, die normalerweise mit der Krankheit assoziiert sind, traten bei dem knochenmarkstransplantierten Patienten nicht auf (Pütsep, Carlsson, et. al. 2002). Im Intestinaltrakt kommt den antimikrobiellen Peptiden ebenfalls eine besonders große Stellung in der Aufrechterhaltung der Abwehrfunktion zu. Jüngste Ergebnisse legen sogar nahe, dass Kommensale durch eine chronische Stimulation der Epithelzellen die Expression antimikrobieller Peptide stimulieren (Boman, et. al. 2000). Die Elimination pathogener Mikroben wird auf diesem Wege unterstützt. Dennoch können manche Erreger die antimikrobielle Barriere überwinden. Bei einer durch *Shigella* verursachten Dysenterie hat man eine starke Expressionsminderung von LL-37 in der frühen Krankheitsphase festgestellt. Der wahrscheinlich durch das Plasmid vermittelte Virulenzfaktor ermöglicht die schnelle Ausbreitung der Infektion (Islam, Bandholtz, et. al. 2001). Interessanterweise wurde die Umgehung der Abwehrfunktion antimikrobieller Peptide auch für pathogene Stämme der *Neisserien* und *Salmonellen* beschrieben. *Neisseria* bedient sich hierfür der multiple transferable-resistance efflux pump (Shafer, Qu, et. al. 1998), *Salmonella* erreicht dies durch eine PhoP-PhoQ-abhängige Lipid-A Azetylierung (Guo, et. al. 1998).

Obwohl die Erforschung der antimikrobiellen Peptide gerade in den letzten Jahren stark vorangeschritten ist, bleiben viele Fragen noch offen. Um sie eventuell einmal gezielt in der Behandlung verschiedenster Erkrankungen einsetzen zu können, sind noch viele Mechanismen, wie auch der Regulationsmechanismus, genauer zu beleuchten. Bei Insekten konnten schon einige Fortschritte in diesem Bereich erzielt werden (Zasloff, Nature 2002). Von den Cathelizidinen weiß man heute, dass sie sicherlich im Rahmen einer Inflammationsantwort durch Keratinozyten induziert werden (Frohm, Agerberth, et. al. 1997). Dennoch konnte erst vor kurzem beobachtet werden, dass typische Inflammationsmediatoren, wie beispielsweise TNF α , IL α , IL-6, IFN γ , IFN α , und LPS, keinen Einfluss auf die Expression von LL-37 in Kolonepithelzellen haben (Schauber, Svanholm, et. al. 2003). Proteinasen der klinisch relevanten Bakterienspezies *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, und *S. pyogenes* führen zur Abnahme des LL-37-Levels. Ob allerdings Proteinase-Inhibitoren auch zu einer vermehrten Induktion führen, bleibt noch offen (Schmidtchen, Frick, et.al. 2002). Auch die Rolle der bereits oben erwähnten Toll-like-Rezeptoren scheint einen nicht unwesentlichen Platz im Regulationsmechanismus einzunehmen. Bereits Studien der Drosophila-Fruchtfliege belegen zudem, dass die Induktion von antimikrobiellen Peptiden auf der Transkriptionsebene stattfindet (Boman, 2000; Boman 1995).

1.3. Histon-Deazetylase-Inhibitoren und Signalwege

1.3.1. Butyrat

Ballaststoffe sind als unverdaubare Kohlenhydrate ein wichtiger Bestandteil unserer Ernährung. Die Kolonflora verfügt über Enzyme, die die im Dünndarm nicht abbaubaren Kohlenhydrate aufspalten. Über Fermentationprozesse anaerober Bakterien entstehen hierbei als Nebenprodukt kurzkettige Fettsäuren (SCFA), wie Acetat, Propionat und Butyrat. Die SCFA-Produktion im Dickdarm beträgt ca. 400 mmol pro Tag (Macfarlane, Cummings, et. al. 1991) wobei durchschnittlich ein molares Verhältnis von 57 : 22 : 21 (Acetat : Propionat : Butyrat) erreicht wird (Cummings, Pomare, et. al. 1987). In Abhängigkeit von den fermentierten Substraten kann dieses Verhältnis jedoch Schwankungen unterliegen. Nur ca. fünf Prozent der im Darm entstehenden SCFA werden im Stuhl ausgeschieden. Der Rest wird vom Menschen metabolisiert. Butyrat wird

von den Epithelzellen aufgenommen und ist in diesem Zusammenhang als primärer Energielieferant für den Zellstoffwechsel von besonders großer Bedeutung (Roediger W. E. W. et. al. 1980). Bis zu 70 % der Energie bezieht das Kolonepithel aus bakteriellen Abbauprodukten. SCFA spielen eine zentrale Rolle in der Erhaltung der mukosalen Barriere im Intestinaltrakt. So konnte im mit Butyrat vorbehandelten Tiermodell eine verringerte Invasion der intestinalen Epithelzellen mit *Salmonella enteritidis* beobachtet werden (Van Immerseel, De Buck, et. al. 2003). Eine Unterversorgung mit SCFA kann eine Inflammation des Kolons, wie die Diversionsscolitis, hervorrufen (Rombeau, Reilly, et. al. 1995). Auch die Pathogenese von Colitits Ulcerosa scheint mit einem Defekt des Butyratmetabolismus assoziiert zu sein (Roediger, 1995; Scheppach, Bartram, et. al. 1995). Gleichzeitig hat Butyrat die Fähigkeit, die zelluläre Immunantwort positiv zu beeinflussen (Cavaglieri, Nishiyama, et. al. 2003). Desweiteren induziert Butyrat Differenzierung, Wachstumsinhibition und Apoptose in verschiedenen kolorektalen Karzinomzellen (Whitehead, Young, et. al. 1986; Mc Bain, Eastman, et. al. 1997). In normalen Epithelzellen jedoch wird die Proliferation durch Butyrat gesteigert. Die molekularen Mechanismen der zum Teil paradoxen Effekte von Butyrat auf normale und neoplastische Zellen sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.3.2. Histon-Deazetylasehemmung

Butyrat ist in der Lage, eine Reihe von Veränderungen im Nukleolus hervorzurufen. Diese beinhalten die Hyperazetylierung von Histonproteinen, die Inhibition der Histon-Phosphorylierung und die DNA-Methylierung (Riggs, Whittaker, et. al. 1977; de Haan, Gevers, et. al. 1986; Boffa, Gruss, et. al. 1981). Von all diesen Effekten ist die Hyperazetylierung von Kernhiston der am besten charakterisierte und scheint eine wichtige Rolle in der Regulation der Gentranskription zu spielen (Hebbes, Thorne, et. al. 1988; Sealy, Chalkley, 1978). Die Histon-Hyperazetylierung wird durch zwei Enzyme katalysiert: die Aktivierung der Histon-Azetyltransferase (HAT) oder die Inhibition der Histon-Deazetylase (HDAC). Butyrat ist unter den SCFA der effektivste nichtkompetitive HDAC-Inhibitor (Kruh, et. al. 1982) und führt besonders bei den Kernhistonen H3 und H4 zu einer Hyperazetylierung (Sealy, Chalkley, 1978). Die HDAC katalysiert die Entfernung des Azetats von modifizierten Lysinresten am N-terminalen Ende der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 (vgl. *Abb. 2*).

Abb. 2

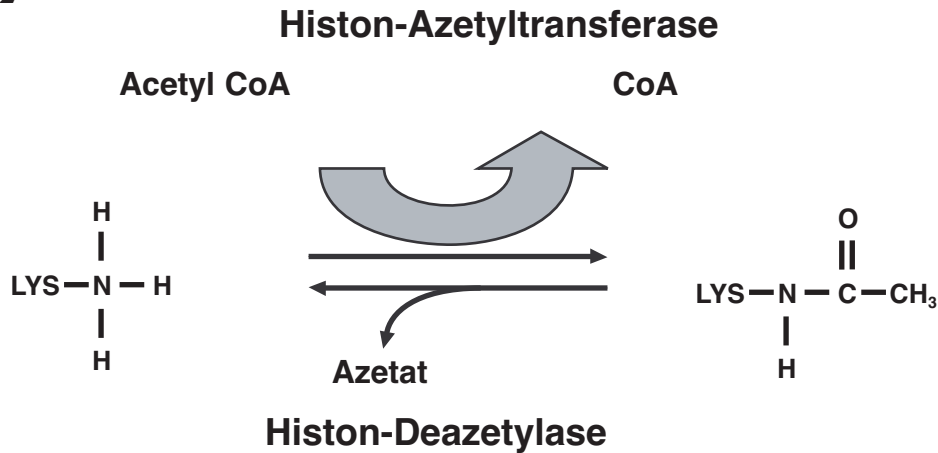


Abb.2. *Dynamische Histon-Azetylierung durch die beiden Enzyme Histon-Azetyltransferase (HAT) und Histon-Deazetylase (HDAC).*

Die jeweils doppelt vorhandenen Kernhistone formen ein Oktamer, um das 146bp der DNA aufgewickelt sind. Somit nehmen sie einen zentralen Platz in der DNA- Verpackung im Nukleosom ein. Die Kristallstruktur hat gezeigt, dass die N-terminalen Enden vom Kern nach außen zeigen, wo sie posttranslational modifiziert werden. Die Azetylierung neutralisiert den positiv geladenen Lysinrest, was die Affinität zur DNA verringert. Das dadurch aufgelockerte Chromatin ist besser zugänglich für Transkriptionsfaktoren, was zu einer Genaktivierung führen kann (Grunstein, 1997). Studien zeigten, dass hohe Azetylierungsgrade der Histone eine Faltung höherer Ordnung verhindern und zugleich eine bis zu 15-fache Transkriptionssteigerung durch die RNA-Polymerase 3 auslösen (Tse, Sera, et. al. 1998).

Ähnlich wie Butyrat bewirkt auch Trichostatin A (TSA), ein aus *Streptomyces platensis* gewonnenes, fungistatisches Antibiotikum, durch Inhibition der Histon-Deazetylase eine Akkumulation stark azetylierter Histone (Yoshida, Beppu, 1988). Im Vergleich zu Butyrat dient es daher oftmals der Bewertung gewonnener Ergebnisse. Beide Substanzen führen zu einer reversiblen HDAC-Inhibition; im Gegensatz zu Butyrat ist die Hyperazetylierung durch TSA allerdings nur transient (Wu, Archer, et. al. 2001). Weiterhin ist bekannt, dass Butyrat auch andere Chromatin-komponenten, wie zum Beispiel Nichthiston-Proteine, modifiziert. Dies kann ebenfalls zu Veränderungen in der Transkriptionsregulation führen.

An der räumlichen Konfiguration der DNA im Nucleus sind neben Histon auch Nichthiston-Proteine beteiligt. Die Familie der Nichthiston-Proteine ist als High Mobility Group (HMG) bekannt. Man unterteilt sie in 3 Subfamilien: HMG-B1/-B2, HMG-A1/-A2 und HMG-N1/-N2. Die drei Familien ähneln sich zwar in ihren physikalischen Eigenschaften, dennoch verfügt jede Subfamilie über einzigartige Kernproteine und eine für sie charakteristische funktionale Sequenz. Diese Sequenz stellt auch die Hauptinteraktionsstelle zwischen HMG-Protein und der DNA dar. HMG-N1/-N2 sind die einzig bekannten Kernproteine, die speziell an die 146bp-Kernsequenz binden. Die Vermutung, dass sie ein wesentlicher Bestandteil der Chromatinfäden sind, liegt nahe (Bustin, Lehn, et. al. 1990; Bustin, Reeves, 1996). Die Bindung der HMG-N1/-N2-Proteine an die Nukleosome führt hier ebenfalls zu einer Entfaltung der höheren Chromatinstruktur und zu einer Steigerung verschiedener DNA-abhängigen Aktivitäten, wie beispielsweise Transkription (Crippa, Trieschmann, et. al. 1993; Paranjape, Krumm, et. al. 1995; Tremethick, Hyman, 1996; Trieschmann, Alfonso, et. al. 1995) und Replikation (Vestner, Bustin, et. al. 1998). Studien über die enzymatische Deazetylierung von HMG-N1 und HMG-N2-Proteinen in Enten-Erythrozyten lassen annehmen, dass beide nukleären Proteine als Deazetylase-Substrat dienen und Butyrat ihre Deazetylierung inhibiert (Sterner, Vidali, et. al. 1981). Dieser Mechanismus ist bereits von anderen HMG-Proteinen und Kernhistonproteinen bekannt (Sterner, Vidali, et. al. 1981). Erst vor kurzem konnte die Assoziation zwischen Butyrat behandelten Zellen und der Hyperazetylierung des HMG-N2-Proteins in HT-29-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine deutliche Abnahme der Bindungsaffinität von HMG-N2 zum Chromatin beobachtet (Lührs, Hock, et. al. 2002).

Zusammenfassend ist sowohl die Hyperazetylierung der Kernhistonproteine als auch die der Nichthiston-Proteine ein wesentlicher Mechanismus, durch den die Transkription von Genen reguliert werden kann.

1.3.3. Signalwege

Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPKs) werden durch extrazelluläre Stimuli aktiviert. Bisher wurden drei verschiedene MAPKs in Säugetierzellen identifiziert: die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) (Boulton, Nye, et. al. 1991; Boulton, Yancopoulos, et. al. 1990), die

Jun NH₂-terminal kinase (JNK) (Derijard, Hibi, et. al. 1994; Kallunki, Su, et. al. 1994; Kyriakis, Banerjee, et. al. 1994; Sluss, Barrett, et. al. 1994) und die p38 Kinase (Han, Lee, et. al. 1994; Lee, Laydon, et. al. 1994; Rouse, Cohn, et. al. 1994). Es handelt sich hierbei um Serin-Threonin Kinasen die durch duale Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten aktiviert werden. Die MAPKs sind an einer Reihe von zellulären Funktionen beteiligt, wie Differenzierung und Apoptose (Ding, Wang, et. al. 2001). Von den drei beschriebenen Signalwegen ist der ERK-Signalweg der am besten charakterisierte. Er wird über Ras reguliert, welches wiederum die Serin-Threonin Kinase Raf-1 aktiviert. Raf-1 phosphoryliert im Anschluss die dual spezifische MAP Kinase Kinase (MEK), die letztendlich über nochmalige Phosphorylierung die Aktivierung von ERK bewirkt. Über die nachfolgende Translokation in den Nukleus reguliert ERK verschiedenste nukleäre Transkriptionsfaktoren (De Silva, Jones, et. al. 1998). ERK1 und ERK2 werden hauptsächlich für die Regulation von Wachstum und Differenzierung verantwortlich gemacht, wohingegen JNK und p38, als durch Stress aktivierte MAPKs, mehr für Apoptose und Stress bezogene zelluläre Antworten zuständig zu sein scheinen (Seger, Krebs, 1995; Davis, 2000; Minden, Karin, 1997; Wilkinson, Millar, 2000) (*Abb. 3*).

Abb. 3

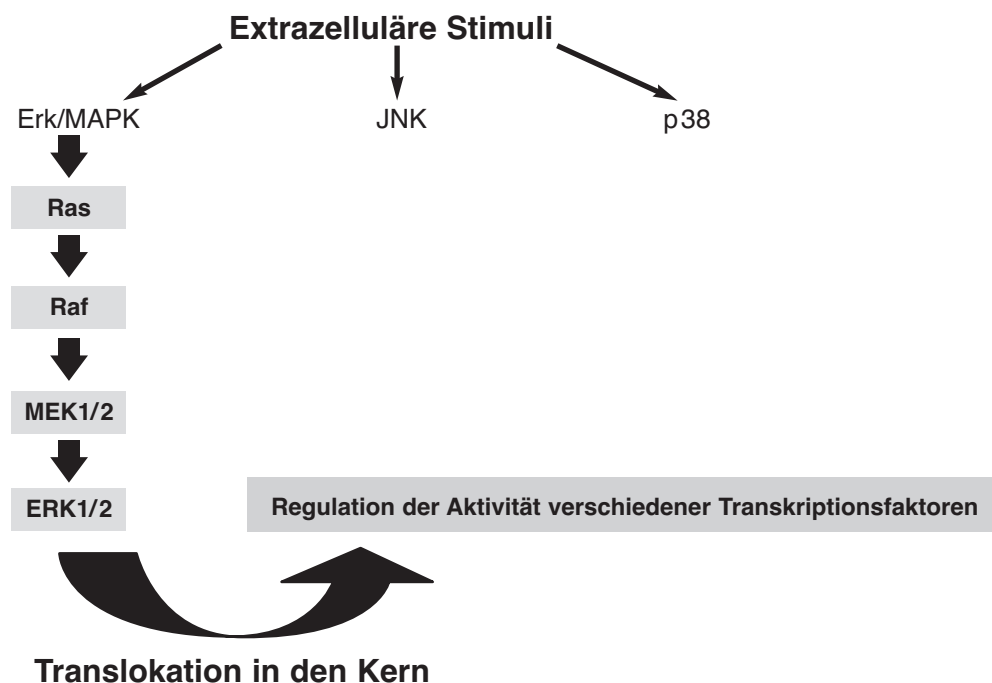


Abb.3. Schematische Darstellung des Ras-/ Raf-/ MEK-/ ERK-Signalweges

Dieses Schema ist jedoch nur ein Anhaltspunkt. Es kann in Abhängigkeit vom Zelltyp oder der Dauer und Stärke des Signals durchaus verändert werden. Desweiteren scheint die Raf-/MEK-/ERK-Signalkaskade auch ein wesentlicher Faktor sowohl in der Produktion von Viren als auch in der Aufrechterhaltung ihres Lebenszyklus zu sein (Pleschka, Wolff, et. al. 2001). So könnten MEK-Inhibitoren beispielsweise als antivirale Therapie eingesetzt werden. Obwohl bereits viel über die Signalkaskaden bekannt ist, sind das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Signalwege und vor allem ihre Aufgaben in einem funktionierenden Organismus noch unbekannt.

1.4. Zielsetzung

Antimikrobielle Peptide sind hinsichtlich der immer häufiger werdenden Resistenzprobleme mit herkömmlichen Antibiotika ein wichtiges Forschungsthema. Ihre Expressionsmuster und Regulationsmechanismen sind jedoch noch weitestgehend unbekannt. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, einerseits die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in gastrointestinalen Karzinomzellen zu untersuchen. Andererseits wurde der Effekt von HDAC-Inhibitoren, wie Butyrat und TSA, auf die Expression von LL-37 in humanen Kolon-, Magen-, und Leberzellen analysiert. Zusätzlich sind die durch HDAC-Inhibitoren hervorgerufenen Effekte in Korrelation mit der Azetylierung von Histon- und Nichthiston-Proteinen in denselben Zellen gesetzt worden. Schließlich wurde die Rolle des MEK-/ERK-Signalweges in der HDAC induzierten Inhibition und Induktion der LL-37 Expression in menschlichen Kolon-, Magen- und Leberzellen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Zellen und Zellkulturexperimente

Drei verschiedenen Zelllinien wurden für die Expressionsstudien untersucht: Die HT-29 Zelllinie (ATCC HTB-38) wurde 1964 von J. Fogh aus einem entdifferenzierten Kolonkarzinom einer 44-jährigen Patientin isoliert (Fogh 1975). HepG2-Zellen (ACC 180) sind humane Zellen eines hepatozellulären Karzinoms, welche 1975 aus dem Tumorgewebe eines 15-jährigen Jungen gewonnen wurden (DMSZ). SC-1-Zellen (23132/ 87) wurden 1978 aus dem Primärtumor einer 72 Jahre alten Patientin mit Adenokarzinom des Magens etabliert (DMSZ, J, 22). HT-29-Zellen und die HepG2-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) bezogen, SC-1-Zellen vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg. Sowohl SC-1-Zellen als auch HepG2-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Life Technologies, Karlsruhe, Germany) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, und 100 µg Streptomycin (Life Technologies) kultiviert. Die Kultivierung der HT-29-Zellen erfolgte in RPMI Medium unter Zusatz von 5 % FBS und 2 mM L-Glutamin. Zur Erstellung einer Standardkurve für die RT-PCR wurden U937-Zellen, eine monozytäre Zelllinie (ACC5, DSMZ Braunschweig, Deutschland) in RPMI Medium, das mit 10 % FBS angereichert war, kultiviert und anschließend mit Butyrat (2 mM) oder Trichostatin A (400 ng/ml) bis zu 48 Stunden behandelt. Alle Zelllinien wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Costar, Cambridge MA, USA) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

1 x 10⁶ Zellen wurden pro jeweiliger Zelllinie und Flasche ausgesät und zu einer 60 - 70 %igen Konfluenz kultiviert, bevor mit den Experimenten begonnen wurde. Nach Zellzyklussynchronisation durch Serumentzug wurden im Anschluss die Testsubstanzen zugegeben und die Zellen für bis zu 48 h inkubiert. Die getesteten Substanzen (Konzentrationen) waren hierbei die HDAC-Inhibitoren Butyrat (2 mM, 4 mM) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany) oder Trichostatin A (200 ng/ml, 400 ng/ml) (Calbiochem, CA, USA). Als Kontrolle wurden die Zellen in Medium ohne Butyratzusatz oder DMSO inkubiert. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

2.1.2. Analyse der Signalwege

Um die Rolle von intrazellulären Signalwegen, wie dem MEK/ERK-Signalweg, auf die durch Butyrat induzierte LL-37 Expression zu überprüfen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden HT-29-, HepG2- und SC-1-Zellen mit und ohne den spezifischen MEK-1-Inhibitor UO126 (20 mM) (Cell Signaling, MA, USA) für bis zu 30 Minuten inkubiert. Erst dann ist dem Zellkulturmedium Butyrat (2 mM) oder Trichostatin A (200 ng/ml) zugegeben worden. Dies wurde danach bis zu weiteren 48 h inkubiert.

2.2. Methoden

2.2.1. RNA-Extraktion

Zu den Zeitpunkten (0 h, 24 h, 48 h) wurde die gesamte RNA aus der adhärent wachsenden Zellfraktion mittels Trifast[®], (Peqlab, Erlangen, Deutschland) extrahiert. Dazu wurde Trifast[®] auf die Zellen gegeben (4 ml pro 75 cm² Zellkulturflasche) und nach kurzer Einwirkzeit die noch adhären Zellen mittels eines Zellschabers zusätzlich gelöst. Das entstehende Zellsuspensat wurde dann in entsprechend gekennzeichnete 1,2 ml Eppendorfgefäße überführt. Hiernach wurden 200 µl Chloroform pro Gefäß zugegeben und kräftig geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Einwirkzeit wurden die Eppendorfgefäße bei 13000 rpm (16060 g) und RT 5 Minuten lang zentrifugiert; dabei kam es zur Phasentrennung. Die oberste, farblos-wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,2 ml fassendes Eppendorfgefäß überführt. Die erwünschte RNA-Präzipitation geschah durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol, wobei die Lösung gevortext und 15 Minuten bei RT inkubiert wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten, bei 13000 rpm und 4 °C. Der Isopropanolüberstand wurde abgossen und das erhaltene Pellet zwecks Waschvorganges je zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol durch Vortexen gelöst und jeweils 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet kurz an der Luft getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.2. RNA-Aufreinigung und die RNase-free DNase Behandlung

Für die RNA Aufreinigung und die DNase Behandlung wurde ein kommerzielles Kit (RNeasy, Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Zu den 100 µl RNA-Lösung wurden 350 µl RLT Puffer, der zuvor mit 10 µl β-Mercaptoethanol (Sigma) pro ml Puffer aktiviert worden war, zugegeben und gemischt. Hierzu wurden 250 µl 100 % Ethanol (Sigma) gegeben. Die entstandene Lösung wurde durch Pipettieren, nicht jedoch durch Vortexen, gemischt. Das gesamte Volumen, 700 µl, wurde auf eine *RNeasy-column* (≙ Säulchen) gegeben und eine Minute bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend verworfen und die Säule mit 350 µl RW1 Puffer mittels einminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm ausgewaschen. Gleichzeitig wurde die DNase Behandlung vorbereitet: Hierzu wurde pro Probenanzahl 10 µl DNase Stock Lösung (RNase-free DNase Set Qiagen) zu 70 µl RDD Puffer gegeben und vorsichtig gemischt. Der erhaltene DNase-Mix (80 µl) wurde auf die Membran der Kolonne getropft und für ca. 30 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde nochmals mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen und eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in eine neue *Collection Tube* gesetzt. Zwei Waschvorgänge mit 500 µl RPE Puffer (vorher versetzt mit 100 % Ethanol (Sigma)) und anschließende Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm folgten. Um die gereinigte RNA zu lösen, wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt, 30 µl RNase-freies Wasser zupipettiert und mindestens eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die gereinigte RNA wurde in diesen 30 µl gelöst.

2.2.3. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden je 10 µl der isolierten RNA (Template) bei 94 °C für 5 Minuten in einem GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems, USA) denaturiert. Gleichzeitig wurde der benötigte Reaktionsmix vorbereitet, der mit dem Template in einem Verhältnis von 1 : 1 stand. Der Reaktionsmix bestand aus 4 µl 5 x First Strand Buffer, 1,5 µl 0,1 M DTT, 1,0 µl Reverse Transcriptase (RT) bei 200 U/µl (Gibco M-MLV-RT Set, USA), 2 µl 2,5 µM dNTP (Gibco Life), 0,5 µl (40 U/µl) Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA) und 1 µl (0,05 µg/µl) N6/Random hexamer primer (Promega). Bei jeder cDNA-Synthese wurde eine interne Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle des RNA-Templates aus 10 µl Wasser bestand. Im GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems) wurden die Proben 40 min

bei 40 °C gewärmt. Es folgte eine 5-minütige Denaturierung bei 94 °C mit anschließendem Abkühlen der Proben auf 4 °C. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.2.4. Real-Time RT-PCR

Um die Expression des Housekeeping Gens G3PDH und LL-37 quantitativ zu bestimmen wurde ein Real-Time RT-PCR Protokoll etabliert. Dafür wurde ein, für LL-37 und G3PDH jeweils unterschiedlicher, Mastermix in 15 ml Falconi-Röhrchen vorbereitet. Das Setup für G3PDH (1x) bestand aus: 12,50 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 1,25 µl Human GAPDH G3 [20x] (Applied Biosystems) und 10,25 µl RNase freiem Wasser. Das G3PDH-PDAR-Housekeeping Kit amplifiziert keine G3PDH Pseudogene. Der Mastermix für LL-37 (1x) setzte sich zusammen aus: 12,5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2,5 µl Forward Primer [3 µM], 2,5 µl Reverse Primer [3 µM] (MWG, Germany), 2,5 µl Probe und 4 µl RNase freiem Wasser. Die durch Primer Express (ABI) konstruierten Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer für die Quantifizierung der LL-37 mRNA lauteten: 5'-ACC CAG CAG GGC AAA TCT C-3', beziehungsweise 5'-GAA GGA CGG GCT GGT GAA G-3'. Die TaqMan Fluoreszenzprobe (Applied BioSystems) für LL-37 hatte die Sequenz 5'-TGT TAT CCT TAT CAC AAC TGA T-3' FAM-gekennzeichnet. Der Mastermix wurde für alle Proben zusammengemischt und jeweils 96 µl davon (vorgesehen für 4 Proben) auf die Eppis verteilt. Anschließend wurde eine sechsfach absteigende Verdünnungsreihe für die Standardkurve hergestellt. Für GAPDH in einem Verhältnis von 1 : 3, für LL-37 in einem Verhältnis von 1 : 1. Die Standardkurve wurde mit einer bekannten Menge totaler RNA aus monozytären U937-Zellen (ACC5, DSMZ Braunschweig Deutschland) erstellt. Anschließend wurde dem zuvor auf die Eppis verteilten Mastermix 4 µl cDNA pro Eppi zugegeben, sodass sich am Ende 100 µl Lösung in jedem Eppi befanden. Anders wurde mit den Proben für den GAPDH-Mix verfahren. Hier wurden dem Mastermix nur 1 µl cDNA und 3 µl Wasser pro Eppi zugegeben. Die Endkonzentration der Proben-cDNA war demnach nur 0,25 µl auf 25 µl Reaktionsvolumen. Die vorbereiteten Eppis wurden kurz gevortext und eine Minute bei max. 3000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurde, nach festgelegtem Schema, die 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode [Code 128] (Applied Biosystems) mit jeweils 25 µl geladen. Alle Werte wurden in Triplikaten bestimmt, um Pipettierungenauigkeiten zu

minimieren. Am Ende wurden Optical-Caps [8 Caps/Stripe] (Applied Biosystems) aufgesetzt und festgedrückt. Kurz bevor die Platte in das PE Applied Biosystems PRISM Model 5600 Sequence Detection Instrument (ABI, Foster City, CA, USA) eingesetzt werden konnte, wurde sie noch maximal eine Minute bei etwa 1,5 x g zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit am Boden der Tubes zu sammeln. Der PCR Lauf wurde nach Eingabe der Standardwerte und der Proben gestartet. Alle Experimente wurden 3- bis 5-fach wiederholt, wobei die RNA Extraktionen voneinander unabhängig waren. Die Ergebnisse wurden im Anschluss zusammengefasst und statistisch verwertet. Das Protokoll für GAPDH sah 40 Zyklen (15 Sekunden bei 95 °C und eine Minute bei 60 °C) vor und wurde mit der Wellenlänge für VIC (530 nm) gemessen. Der Zyklus für LL-37 (15 Sekunden bei 92 °C und eine Minute bei 60 °C) wurde 50 mal durchlaufen, wobei die Sonde FAM-markiert war.

Während der PCR Amplifikation spaltet die Taq-Polymerase mit ihrer 5' nukleolytischen Aktivität die Probe, wobei ein Fluoreszenzlicht emittiert wird. Die 5' Reporterfluoreszenzwellenlänge und die 3' Kontrollwellenlänge (Gibson UE, Heid CA, Williams PM. *Genome Res.* 1996; 6(10):995-1001) werden jeweils vom Laser gemessen. Die Quantifizierung der RT-PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder Ct-Wert. Der Ct-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert signifikant überschreitet. Dieser Schwellenwert korreliert indirekt proportional mit dem mRNA Ausgangsniveau. Die LL-37- und GAPDH-Mengen in den unbekanntenen Proben wurden dadurch quantifiziert, dass der Schwellenwert, der so genannte Ct-Wert, festgelegt wurde. Anhand des Schwellenwertes wird der korrespondierende Wert auf einer definierten Standardkurve abgelesen (*Abb. 4*).

Abb. 4 a)

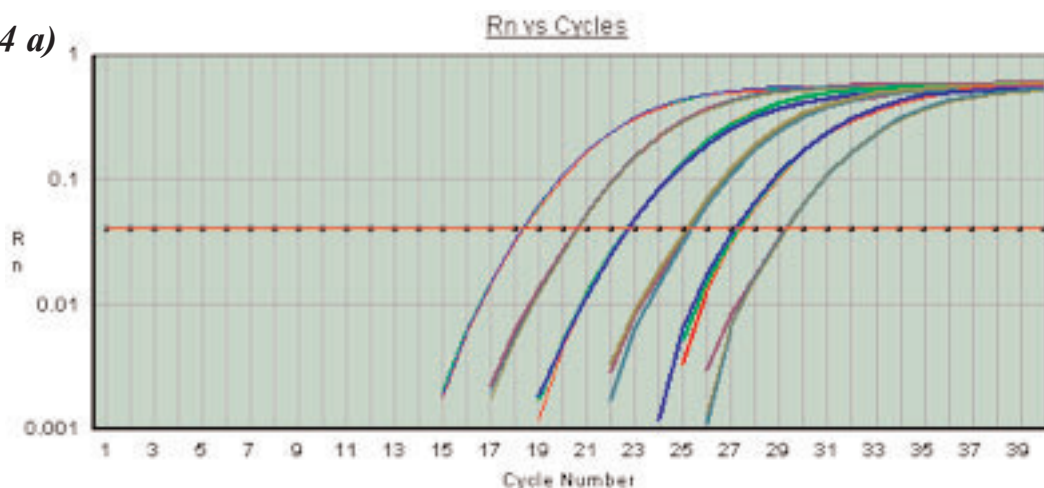


Abb. 4 b)

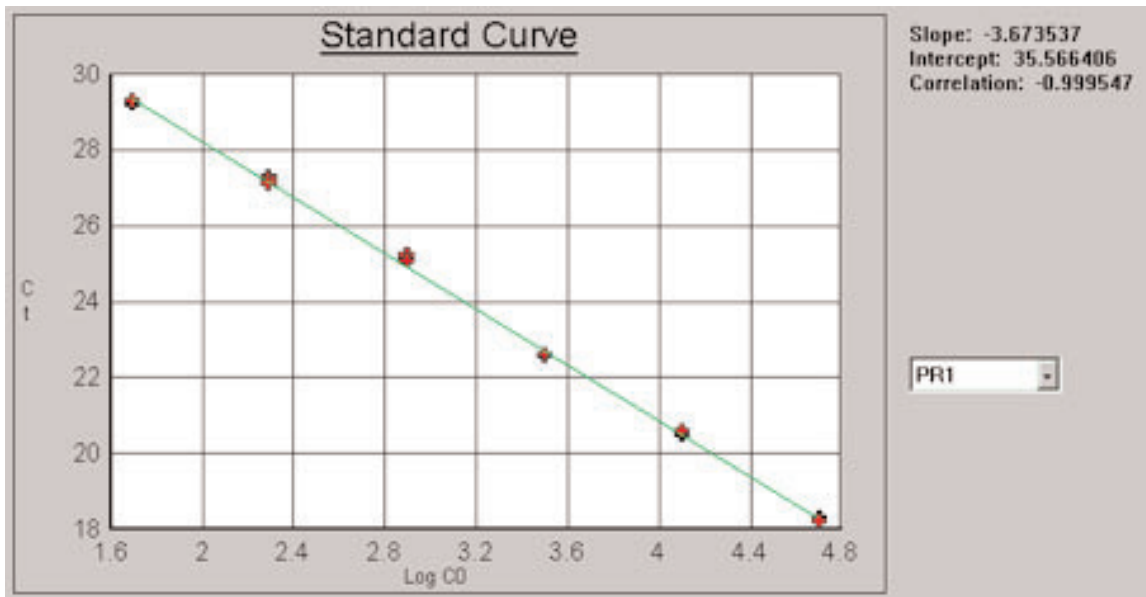


Abb.4. Amplifizierung von GAPDH in HepG2-Zellen .

- a) Amplifizierungsplot der die Fluoreszenzveränderung gegen die Zyklus-Nummer zeigt.
- b) Standardkurve: auf jeder Analyseplatte wurde eine Standardkurve aus bekannten cDNA Verdünnungen, synthetisiert aus U937 Monozyten, verwendet.

Daraufhin wurde das Verhältnis aus der LL-37/GAPDH Transkriptionsmenge gebildet. Um Expressionsunterschiede zu verdeutlichen, wurden die LL-37 Expressionslevel in der Mediumkontrolle bei LL-37 exprimierenden Zellen (HT-29) auf eins gesetzt. Um die relative LL-37 Expression zu errechnen, wurde die LL-37 Expression in behandelten Zellen in Beziehung zum Expressionsniveau in Kontrollzellen gesetzt. Die Zelllinien HepG2 und SC-1 exprimierten, sowohl unbehandelt als auch mit der Mediumkontrolle behandelt, kein LL-37. Um in diesen Zellen die LL-37 Expression zu quantifizieren, wurde der LL-37 Expressionsgrad nach 24-stündiger Behandlung mit 2 mM Butyrat als 1 definiert. Alle anderen LL-37-Expressionslevel wurden als relative Induktion hierzu angegeben.

2.2.5. Western-Blot

2.2.5.1. Protein-Aufbereitung für LL-37 Western-Blot

Die Azetylierungsgrade von Histon- und Nichthiston-Proteinen wurden mittels Western-Blot analysiert. Hierzu wurden HT-29-Zellen, HepG2-Zellen und SC-1-Zellen, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, mit Butyrat (2 mM, 4 mM) oder TSA (200 ng/ml, 400 ng/ml) bis zu 48 h behandelt. Die Zellen wurden trypsinisiert und in 4 °C kaltem Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 50 µM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 0,01 U/ml Aprotinin, 1 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 10 µg/ml Pepstatin (pH 7,4) (Alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland außer Tris-HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und homogenisiert.

2.2.5.2. Protein-Konzentrationsmessung

Die Protein-Konzentrationen der Lysate wurden photometrisch bei 750 nm durch das Tecan-Spectra-Spektroskop (Tecan, Crailsheim, Deutschland) ermittelt. Dazu wurden 230 µl 0,1 % TFA als Leerwert pipettiert, deren Wert von den anderen unbekanntem Werten anschließend subtrahiert wurde. Eine Standardkurve mit Rinderalbumin (BSA Fraction V, Boehringer, Mannheim) wurde angesetzt. Die 1. Lösung der absteigenden Verdünnungsreihe enthielt 5 mg/ml Albumin; nachfolgend wurde immer 1 : 1 mit 0,1 % TFA verdünnt. Hiervon wurden jeweils 5 µl für die Messung entnommen. 1 µl der Proben wurde pro Well geladen; jeder Wert wurde doppelt bestimmt. Nun wurden zu jedem Well 25 µl Protein-Assay Reagent A (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegeben und diese schließlich noch mit 200 µl Reagent B pro Well, ergänzt. Die Platte wurde 15 min stehen gelassen und dann gestartet. Die Proteinmengen wurden mit MSExcel berechnet.

2.2.5.3. Western-Protokoll LL-37

Für die Western-Blot-Probenvorbereitung wurde ein SDS Sample Buffer benötigt (2,0 ml 1,0 M Tris-Hydrochlorid pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Deutschland); 4,0 ml 100 % Glycerol (Sigma); 2,0 ml 10 % SDS (Bio Rad); 0,8 ml 0,5 % Coomassie Blue G (Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und 1,0 ml doppelt destilliertes Wasser). Der Puffer wurde durch einen 0,2 µm Filter (Falcon, Heidelberg, Deutschland) steril filtriert

und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dieser Sample Buffer (SB) wurde zur Weiterverarbeitung mit Mercaptoethanol (Sigma) vermischt (2 µl pro 100 µl SB). Es wurde die pro Spur benötigte Proteinmenge für den späteren Western-Blot berechnet. Jede Geltasche wurde mit gleichen Proteinmengen beladen. Teilweise war deswegen eine Verdünnung mit 0,1 % TFA notwendig. Anschließend wurden die Proben in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit Sample Buffer vermischt. Das Verhältnis zwischen Probe und SB war hierbei 1 : 2. Dann wurden die Proben 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert und 1 h bei 56 °C im vorgewärmten Wasserbad inkubiert. Zuletzt wurden sie im Wärmeblock 5 min auf 95 °C erhitzt und noch einmal 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert.

2.2.5.4. *Elektrophorese*

Gekühltes Novex-Tricingel (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen und diese mit 1 : 9 verdünntem Reservoir-Buffer (121,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland), 179,2 g Tricine (Invitrogen GmbH), 10 g SDS (Bio-Rad), mit DEPC-Wasser aufgefüllt auf 1000 ml, pH 8,3), gefüllt. Die Kämme wurden entfernt und die Geltaschen gespült. Nach dieser Vorbereitung wurden sowohl die Proben als auch mindestens einmal 10 - 15 µl eines farbig markierten, standardisierten Proteingrößenmarkers (SDS-PAGE Standards, Bio-Rad) geladen. Die Elektrophorese lief bei konstant 200 V, bis die Marker-/Proteinfront gerade die Unterkante des Gels erreicht hatte.

2.2.5.5. *Blotting*

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch auf eine auf Filtergröße zurechtgeschnittene, mit 100 % Methanol kurz aktivierte PVDF Membran (Immobilion-membrane, Millipore, Bedford, MA) mittels Elektroblothing bei konstanter Stromstärke von 150 mA überführt (Trans Blot System, BioRad; EC-Apparatus EC140, EC-Apparatus Co., Holbrook NY, USA). Dazu wurden die aktivierte PVDF Membran, Schwämme und Whatman-Filterpapier in 100 ml Transfer Buffer, 200 ml Methanol (Sigma) und 700 ml ddH₂O eingelegt. Der Transfer Buffer bestand hierbei aus 30,3 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck) und 144 g Glycin (Sigma), die auf 1000 ml ddH₂O aufgefüllt

wurden. Das Gel wurde ebenfalls kurz in Transfer Buffer gelagert. In der Blottanordnung wurden die Membran und das Gel direkt aufeinander gelegt und von beiden Seiten mit zurechtgeschnittenem Filterpapier und Schwämmen belegt, so dass die Proteine auf die Membran transferiert werden konnten.

2.2.5.6. *Färbung*

Nach dem Blotten wurde die Membran aus der Blottanordnung gelöst und 5 min in PBS (Gibco, USA) gewaschen. Darauf folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen in 15 ml 5 % Milch in TBS (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4). Anschließend wurde die Membran 5 Minuten in PBS gewaschen, worauf die Inkubation mit dem 1 : 1000 verdünnten Primärantikörper (antiacetylated HMG-N2) in 5 % Milch in PBS bei 4 °C für eine Stunde folgte. Der Antikörper erkennt azetyliertes HMG-N2, nicht jedoch unazetyliertes, rekombinantes HMG-N2 oder HMG-N1. Um das azetylierte Histon H4-Protein zu detektieren, wurde ein spezifischer Antikörper von Cell Signaling benutzt (CA, USA). Die ungebundenen Reste des Primärantikörpers wurden durch 5-minütiges Waschen mit PBS und 0,25 Tween und zweimaligem 10-minütigen Waschvorgang mit reinem PBS abgespült. Die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Rabbit 1 : 10.000, Promega, Mannheim) in 5 % Milch in PBS für eine Stunde bei RT schloss sich an. Nun folgten vier Waschvorgänge: 1 x 5 Minuten mit PBS und 0,25 Tween; 2 x 10 Minuten mit PBS und 1 x 5 Minuten mit ddH₂O. Der gebundene Sekundärantikörper wurde mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mit Filterpapier getrocknet und dann 5 Minuten lang mit je 1 ml beider Reagentien des Super-Signal[®] West Pico Trial Kit (Pierce, Rockford, Illinois) entwickelt. Bei dieser Nachweismethode kommt es zu einer HRP-katalysierten Oxidation von Diazylhydrazid und nachfolgender Lichtemittierung, die durch Belichtung von lichtsensitiven Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham) aufgezeichnet wurde. Die Belichtungszeiten lagen hierbei zwischen wenigen Sekunden und mehreren Minuten.

2.2.6. Immunhistochemie

Zur Untersuchung der LL-37 Expression in verschiedenen Geweben wurde Probenmaterial aus Magenkarzinom-, Kolonkarzinom- und Leberzellkarzinomgewebe vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg bezogen. Die Biopsien wurden mit einer Standardbiopsiezange entnommen und unverzüglich in 0,3 % Formalin gelagert. Danach werden die Biopsien entwässert. Anschließend werden sie in einen Paraffinblock eingebettet. Nach der Aushärtung werden die Biopsien mit dem Jung SM 2000R Mikrotom (Leica, Deutschland) in ungefähr 3 - 4 µm dicke Schichten geschnitten. Es folgt eine Behandlung mit Streckwasser auf dem Objektträger. Das Streckwasser wurde immer frisch aus doppelt destilliertem Wasser, 10 ml Azeton (J. T. Baker, Deventer, Holland) und 0,5 ml Eiweiß-Glycerin (Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH + Co, Köngen/N., Deutschland) angesetzt und filtriert. Danach können die Schnitte nach dem Färbungsprotokoll auf dem Objektträger gefärbt werden: Alle auf dem Objektträger befindlichen Schnitte wurden zuerst dreimal jeweils für 10 min mit Xylol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) entparaffiniert, darauf folgten gestaffelte Waschvorgänge: zweimal 5 min mit 100 % Ethanol (J.T.Baker), zweimal mit 90 % Ethanol für 5 min und zweimal jeweils 5 min mit 70 % Ethanol. Die Objektträger mit den Biopsien wurden weiter vorbehandelt mit MeOH (J.T.Baker). Dazu wurden sie nach der Ethanollagerung 30 min bei RT in 200 ml 100 % Methanol umgesetzt, die mit 5 ml konzentriertem H₂O₂ (Merck) versetzt waren. Nun wurden die Biopsien zweimal 5 min mit PBS/BSA (36 g NaCl, 7,4 g Na₂HPO₄, 2,5 g KH₂PO₄, destilliertes Wasser, pH 7,4) auf dem IKA-Vibramax-VXR (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gespült. Am Färbetag wurde jeweils pro Liter PBS 0,5 g BSA zugegeben. Vom Proteinblockingagens BioGenex – 1 : 10 verdünnt mit destilliertem Wasser – wurden 100 µl pro Schnitt aufgetragen und 7 min bei RT in der feuchten Kammer gelagert. Es wurde zweimalig 1 min mit PBS/BSA auf dem Vibramax gespült. Die Serienschnitte wurden nun mit einer 1/1000 Verdünnung eines spezifischen polyklonalen LL-37 Kaninchenantiserums (2,5 µg/µl) über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Serienschnitte aus gesunder kolorektaler Mukosa. Für die Negativkontrolle wurde der Primärantikörper zuvor schon von einer Überschussmenge an synthetisch hergestelltem LL-37 Peptid absorbiert und somit geblockt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder auf dem Vibramax zweimal für 1 min mit PBS/BSA gewaschen. Aus dem Biotin-Streptavidin Detektions-

system (Multilink®, BioGenex, CA) verwendet man 1 - 3 Tropfen Multilink und 1 - 3 Tropfen Label. Dazwischen und anschließend wurden die Proben 30 min bei RT in der feuchten Kammer gelagert. Hier wurden sie noch zweimal je 1 min mit PBS/ BSA auf dem Vibramax gespült. Zur Entwicklung der Schnitte wurden 200 µl einer hergestellten Lösung benötigt. Hierzu wurden 7,88 g Tris-Hydrochlorid (Merck), die bei pH 7,6 in 1 l destilliertem Wasser gelöst worden waren, 40 mg DAB (Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 35 µl H₂O₂ (Merck) gemischt. Beim zweiten Anitkörper wurde die Entwicklung je nach gewünschtem Ergebnis nach 1 - 2 min mit PBS/BSA gestoppt und das Präparat ca. 1 - 2 min unter destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Präparate für maximal 3 sec in Mayer's Hämalaun (Merck) gelagert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben in eine aufsteigende Alkoholreihe gelegt und mit Entellan (Merck) eingedeckt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Mikroskops (Leica, Deutschland) beurteilt.

2.3. Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit SigmaStat Version 2.03 (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde angewandt, um die Daten auf Normalverteilung zu testen, der Student t-Test, um statistische Unterschiede zwischen den Versuchen und der Kontrolle zu berechnen. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0.05$ angenommen. Die dargestellten Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei verschiedenen, voneinander unabhängigen Experimenten.

3 Ergebnisse

3.1. Das Cathelizidin LL-37 wird von humanen Kolon-, Magen- und hepatozellulären Karzinomzellen nicht exprimiert

Um herauszufinden, ob LL-37 mRNA oder das Peptid in Karzinomzellen von kolorektalen, gastrointestinalen oder hepatozellulären Tumoren exprimiert wird, waren verschiedene Analysen notwendig. So wurde die Expression des LL-37- Peptids *in vivo* mittels Immunohistochemie an Gewebsschnitten kolorektaler, gastrointestinaler und hepatozellulärer Karzinomzellen untersucht. Diese wurden hierfür mit einem spezifischen LL-37-Antikörper immunologisch gefärbt. Im Gegensatz zu nichttransformierten Kolonepithelzellen konnte kein LL-37 in Kolon-Karzinomzellen nachgewiesen werden (Abb.5). Auch in gastralen und hepatozellulären Karzinomzellen ließ sich kein LL-37 Peptid nachweisen (nicht dargestellt). Desweiteren konnte mittels Real-Time RT-PCR keine LL-37 mRNA in frisch isolierten Zellen des Kolon-Karzinomgewebes detektiert werden. *In vitro* exprimierten bestimmte Kolon-Karzinom-Zelllinien (SW620) gar keine LL-37 mRNA, andere nur bei einem sehr geringen basalen Level (HT-29). Parallel hierzu fanden sich auch bei den hepatozellulären (HepG2) und den gastrointestinalen Karzinomzellen (23132/87) nur geringe LL-37 Expressionslevel.

Abb. 5

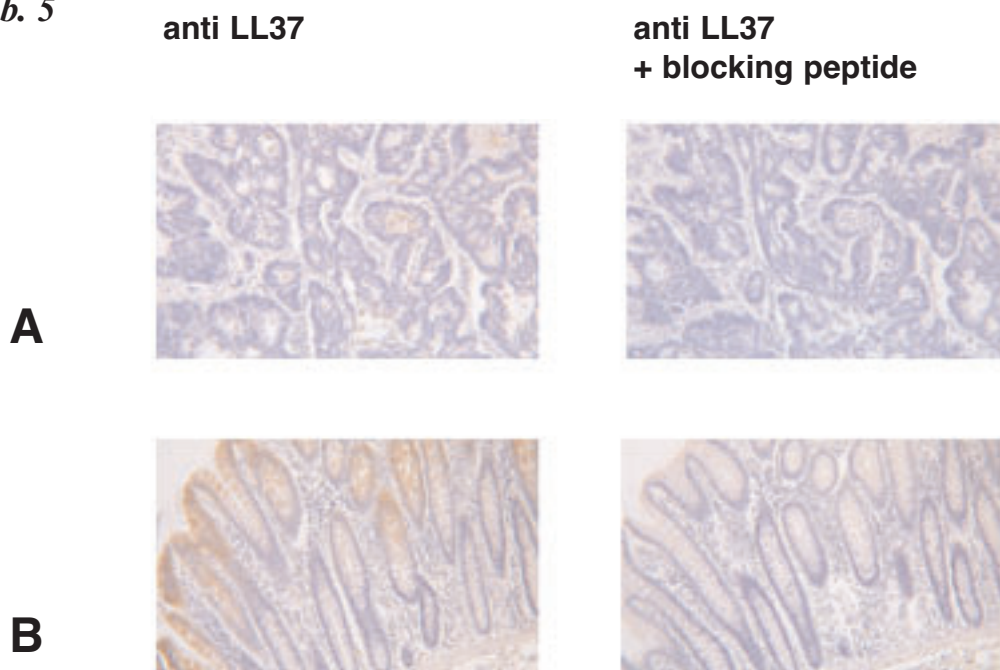


Abb.5. *LL-37-Expression in kanzerogenem Gewebe des Kolons.*

Links: Die LL-37- Expression wurde in Proben von kolorektalem Tumor analysiert (A). Die LL-37-Expression wurde in kolorektalen Biopsien von Gesunden durch das Färben von Serienschnitten mit dem polyklonalen Antikörper für LL-37 untersucht (B). Die Proben sind bei einer 250-fachen Vergrößerung gezeigt.

Rechts: Als Negativkontrolle wurde der erste Antikörper durch synthetisches LL-37 vorabsorbiert.

3.2. Histon-Deazetylase-Inhibitoren induzieren die Expression von LL-37 in Kolonepithelzellen, Hepatozyten und Magenepithelzellen

Um herauszufinden, ob HDAC-Inhibitoren die Genexpression des Cathelizidins LL-37 induzieren, wurden Versuche mit Kolon- (HT-29), Magen- (23132/87) und hepatozellulären (HepG2) Karzinomzellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem natürlichen (Butyrat) und einem synthetischen (Trichostatin) HDAC-Inhibitor in unterschiedlicher Konzentration für bis zu 48 Stunden inkubiert (*Abb. 6 - 11*).

Die Inkubation der HT-29-, HepG2- und 23132/87-Zellen mit dem HDAC- Inhibitor Butyrat führt zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion der LL-37 Genexpression. Dies wurde mittels Real-Time-PCR Versuchen analysiert (*Abb. 6, 8, 10*). In HT-29-Zellen konnten höhere Butyratkonzentrationen nach 24 Stunden einen stärkeren Effekt auf die LL-37 Expression als nach 48 Stunden ausüben. In 23132/87-Magenzellen und HepG2-Leberzellen hingegen trat bei niedrigeren Butyratkonzentrationen ein eindeutigerer Effekt als vergleichsweise bei hohen Butyratdosen auf. Der synthetische HDAC Inhibitor TSA induzierte die LL-37 Genexpression signifikant in allen drei Zelllinien (*Abb. 7, 9, 11*). Jedoch konnte bei der Inkubation mit TSA im Vergleich zu Butyrat nur eine transiente Wirkung auf die Genexpression von LL-37 festgestellt werden: Während kurze Inkubationszeiten einen deutlichen Effekt auf die Expression zeigten, konnte bei längeren Inkubationszeiten nur ein verminderter Effekt beobachtet werden. So konnte beispielsweise ein signifikanter Effekt in allen drei Zelllinien nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit TSA $p = 200$ ng/ml festgestellt werden; nach 48-stündiger Inkubationszeit jedoch war dies in allen drei Zelllinien nicht signifikant (*Abb. 7, 9, 11*).

TSA 400 ng/ml konnte keine weitere LL-37 Induktion in den untersuchten Zellen bewirken. Wiederum zeigte sich ein transienter Effekt auf die LL-37 Genexpression in den 23132/87-Magenzellen. Bei HepG2- und HT-29-Zellen führte die verlängerte Inkubation mit 400 ng/ml TSA nicht zu höheren Transkriptionsleveln.

Insgesamt kann zudem festgestellt werden, dass die eingesetzten Butyrat-Konzentrationen in allen drei Zelllinien einen stärkeren Effekt auf die LL-37 Genexpression als TSA ausüben könnten.

3.2.1. HT-29 Inkubation mit Butyrat

HT-29-Kolonzellen, die mit Butyrat (2 mM) inkubiert wurden, zeigten einen 3,6-fachen Anstieg der LL-37 Transkripte nach 24 h Inkubation und eine (jeweils im Mittel) 16,5-fache Induktion nach 48 Stunden, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (*Abb. 6*). Nach 24 Stunden mit einer 4 mM Butyratlösung stieg die LL-37 Transkriptmenge um das 4,3-fache (gemittelt), beziehungsweise um das 23-fache nach 48 Stunden an, jeweils im Vergleich zur Kontrolle (*Abb. 6*).

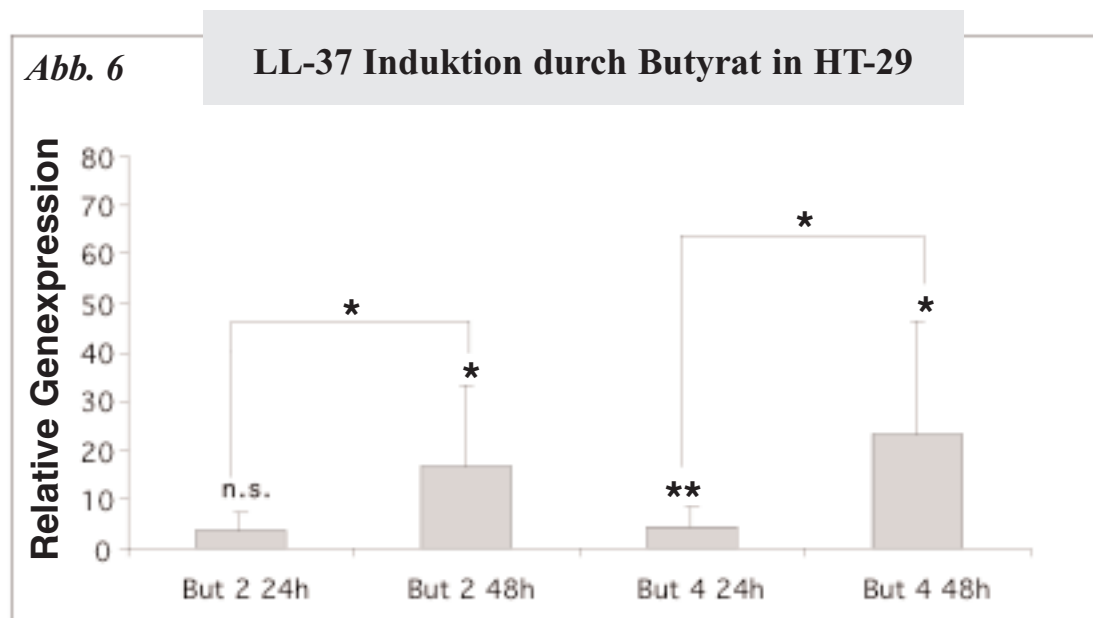


Abb.6. Induktion der LL-37 Transkription in HT-29-Kolonzellen, die mit 2 mM und 4 mM Butyrat über bis zu 48 h inkubiert wurden. Die relative Genexpression von LL-37 bei HT-29-Zellen ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Mittel \pm Standardabweichung. (n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$).

3.2.2. HT-29 Inkubation mit Trichostatin

HT-29-Zellen, die mit TSA inkubiert wurden, zeigten im Mittel bei einer Inkubation mit 200 ng/ml einen 1,3-fachen Anstieg nach 24 Stunden und einen 1,1-fachen Anstieg nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Inkubation mit TSA 400 ng/ml konnte ein 1,9-facher (24 Stunden), sowie ein 4,4-facher (48 Stunden) Anstieg der Transkriptionsmenge ermittelt werden.

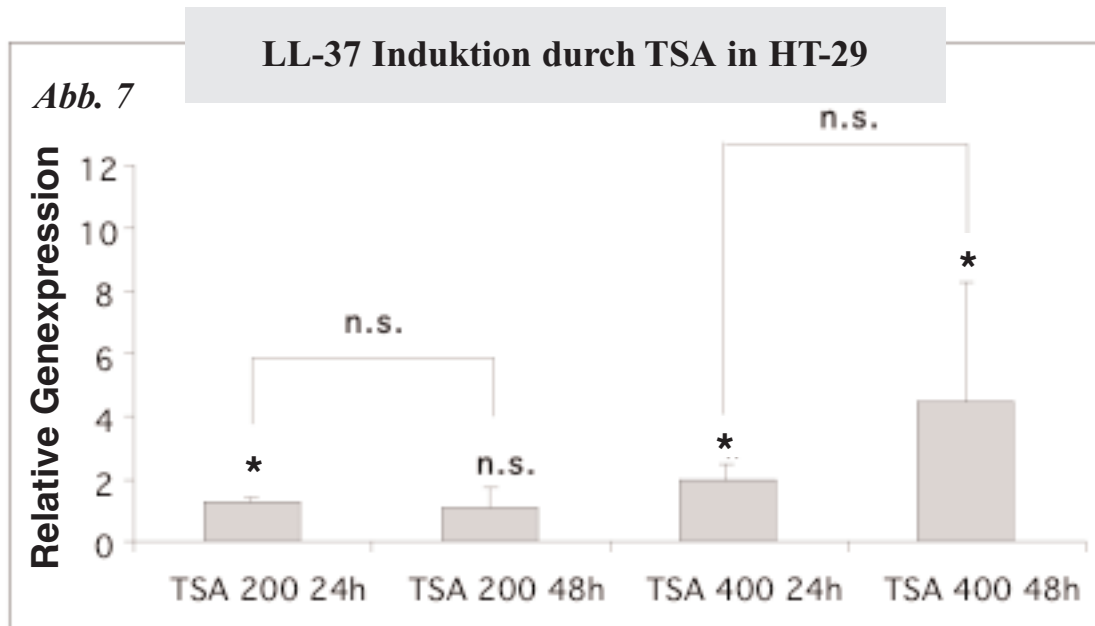


Abb.7. Induktion der LL-37 Transkription in HT-29-Kolonzellen, die mit 200 ng/ml und 400 ng/ml Trichostatin über bis zu 48 h inkubiert wurden. Die relative Genexpression von LL-37 bei HT-29-Zellen ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

*(n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$).*

3.2.3. HepG2 Inkubation mit Butyrat

Die Butyratinkubation der HepG2-Zellen zeigte in gleichem Maße einen zeit- und dosisabhängigen Effekt. Bei 2 mM ergab sich nach 24 Stunden eine 44,7-fache und nach 48 Stunden eine 142,5-fache Induktion im Vergleich zur Kontrolle (Werte gemittelt). Mit 4 mM Butyrat stieg die LL-37 Transkriptionsmenge im Mittel um das 16,1-fache nach 24 Stunden und das 70,9-fache nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle an.

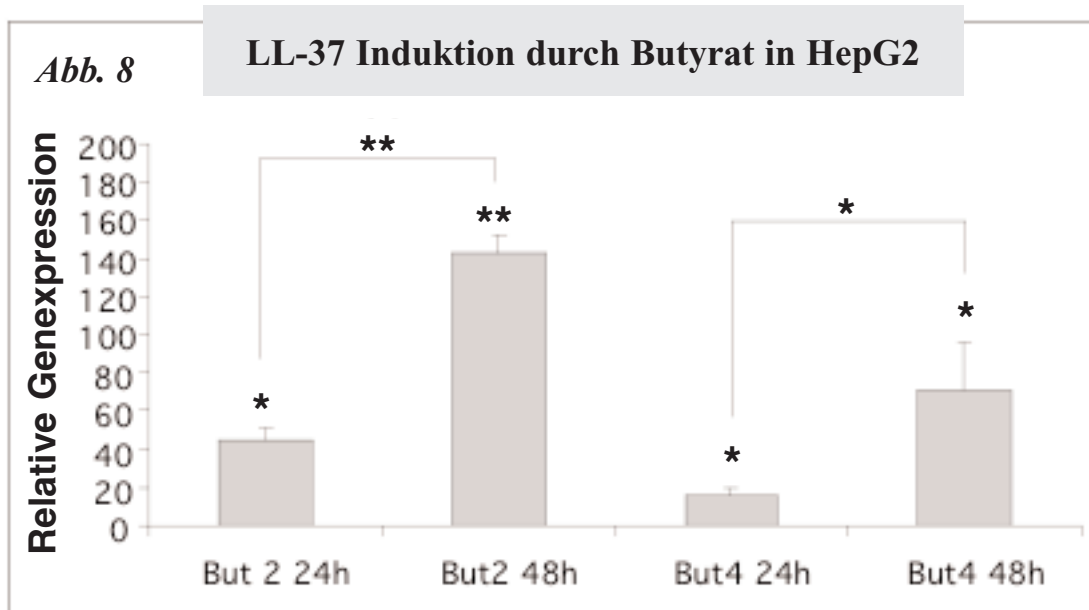


Abb.8. Induktion der LL-37 Transkription in HepG2 hepatozellulären Zellen, die mit 2 mM und 4 mM Butyrat über bis zu 48 h inkubiert wurden. Die relative Genexpression von LL-37 bei HepG2-Zellen ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. (n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$).

3.2.4. HepG2 Inkubation mit Trichostatin

Bei den mit TSA 200 ng/ml inkubierten HepG2-Zellen zeigte sich nach 24 Stunden eine 46,5-fache und 2,5-fache Induktion nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Die Steigerung der TSA-Konzentration auf 400 ng/ml ergab im Mittel nach 24 Stunden eine 15,2-fache und nach 48 Stunden eine 24,7-fache Induktion.

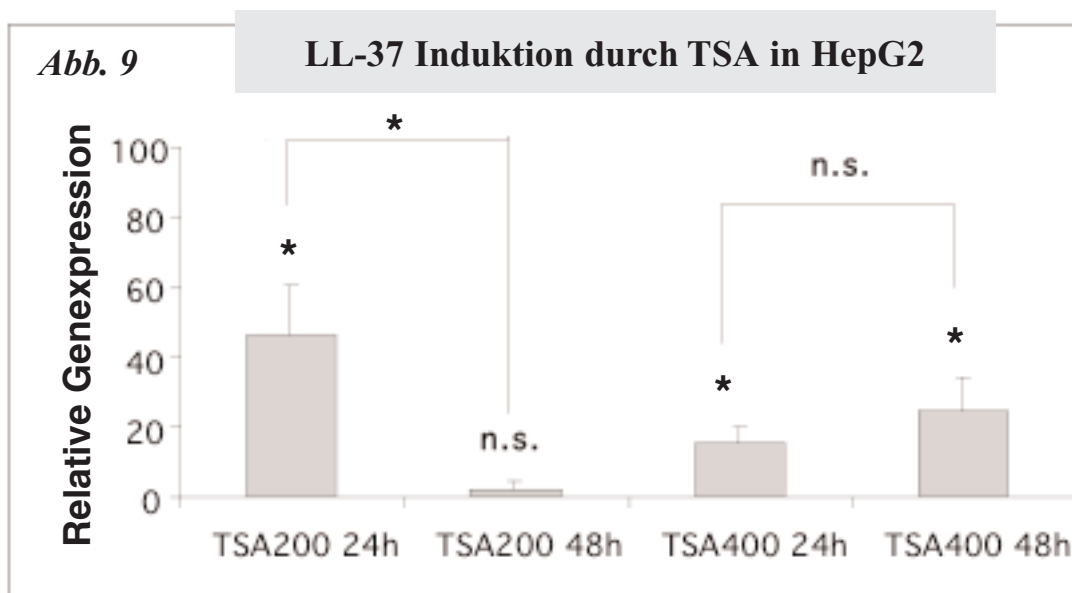


Abb.9. Induktion der LL-37 Transkription in HepG2 hepatozellulären Zellen, die mit 200 ng/ml und 400 ng/ml Trichostatin über bis zu 48 h inkubiert wurden. Die relative Genexpression von LL-37 bei HepG2-Zellen ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.
(n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$).

3.2.5. 23132/87-Zellen Inkubation mit Butyrat

Nach 24-stündiger Inkubation der 23132/87-Zellen mit 2 mM Butyrat ergab sich im Mittel eine 16,2-fache Induktion im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48 Stunden stieg die Induktion auf das 19,9-fache. Die 4 mM Butyratkonzentration zeigte gemittelt einen 16,9-fachen Anstieg nach 24 Stunden, sowie einen 35,2-fachen Anstieg der LL-37 Transkription nach 48 Stunden.

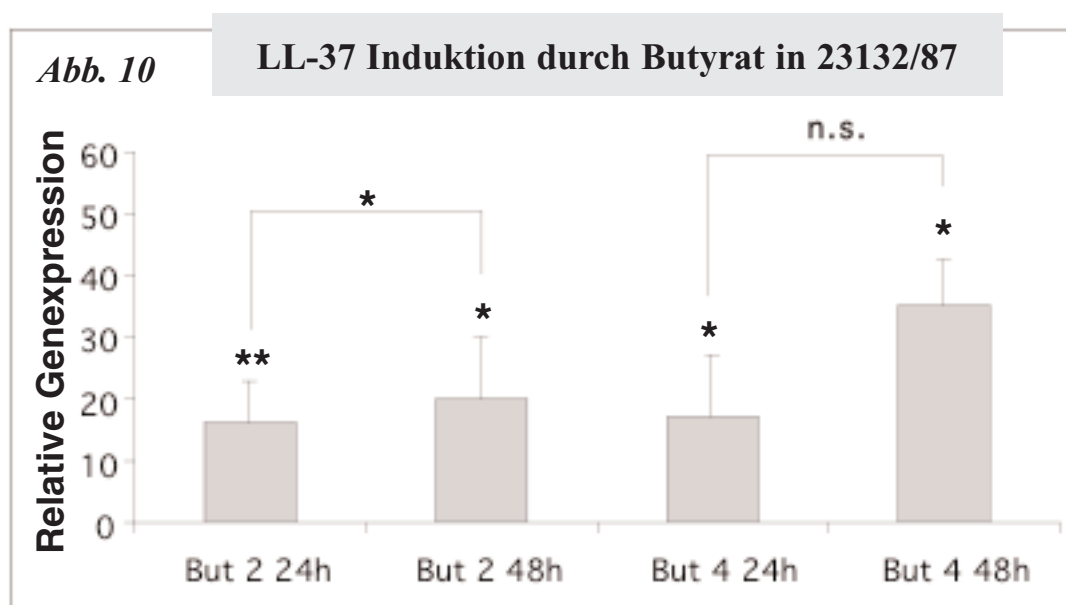


Abb.10. Induktion der LL-37 Transkription in 23132/87 gastrointestinalen Zellen, die mit 2 mM und 4 mM Butyrat über bis zu 48 h inkubiert wurden. Die relative Genexpression von LL-37 bei 23132/87-Zellen ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.
(n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$).

3.2.6 23132/87-Zellen Inkubation mit Trichostatin

Eine 200 ng/ml TSA-Konzentration löste in 23132/87-Zellen im Mittel nach 24 Stunden einen 3,7-fachen, nach 48 Stunden einen 0,5-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle aus. Die 400 ng/ml TSA-Konzentration ergab schließlich einen 8,5-fachen Anstieg nach 24 Stunden und einen 1,4-fachen Anstieg nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.

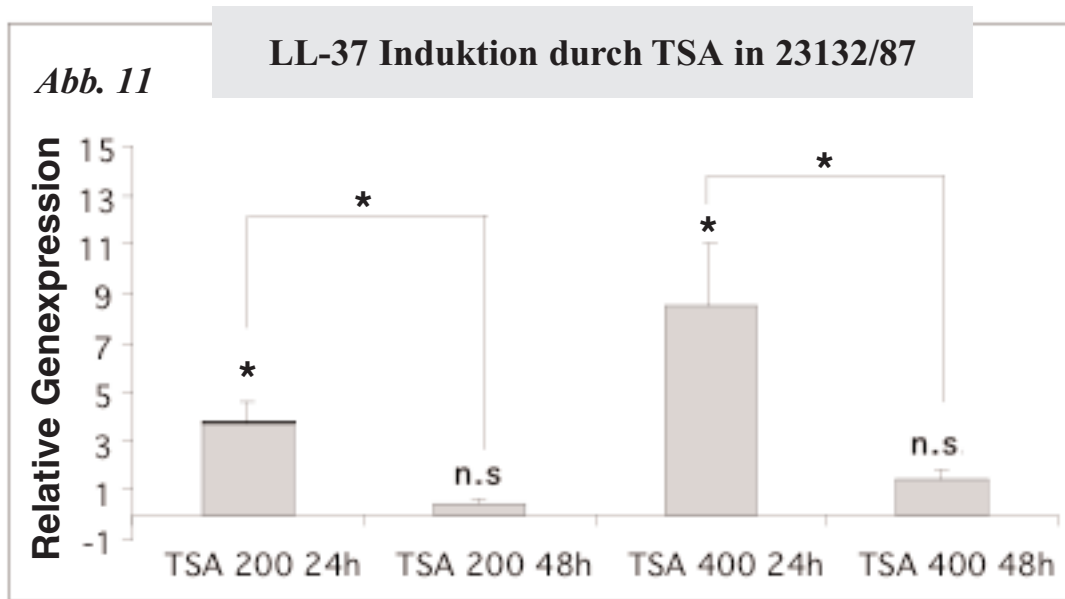


Abb.11. Induktion der LL-37 Transkription in 23132/87 gastrointestinalen Zellen, die mit 200 ng/ml und 400 ng/ml Trichostatin über bis zu 48 h inkubiert wurden. Die relative Genexpression von LL-37 bei 23132/87-Zellen ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. (n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$).

3.3. Histon-Deazetylase-Inhibitoren modulieren Histon- und Nichthiston-Proteine in den untersuchten Kolonepithel-, Magen- und hepatozellulären Zelllinien

Viele Butyrateffekte hängen mit einer reversiblen Inhibition der Histon-Deazetylase zusammen. Dies führt zu einer Modulation der Histon- und Nichthiston-Proteine, die eine Aktivierung oder Suppression der Gentranskription zur Folge hat (Lührs, Hock, et.al. 2002; Mc. Knight, Hager, et. al. 1980). Um zu evaluieren, ob die Induktion des Cathelizidins LL-37 durch HDAC-Inhibitoren in den untersuchten Zelllinien mit der

Modulation von Kernproteinen assoziiert ist, wurden nach Behandlung der Zellen mit Butyrat oder Trichostatin Western-Blot-Analysen der Zelllysate durchgeführt. Die Behandlung mit Butyrat induzierte eine zeit- und dosisabhängige Azetylierung des Nichthiston-Proteins HMG-N2 und des Histon-Proteins H4 in HT-29 Kolon-, 23132/87- bzw. SC-1-Magen- sowie HepG2-Leberzellen (*Abb. 8 - 10*). Im Gegensatz dazu ergaben die Western-Blot-Analysen keinen Unterschied hinsichtlich des Gesamtgehaltes des HMG-N2-Proteins dieser Zellen (Daten nicht gezeigt). TSA führte ebenfalls zu einer Induktion der Azetylierung von HMG-N2 und H4 in allen drei Zelllinien. Jedoch hatte die Behandlung mit TSA, im Gegensatz zu Butyrat, nur einen vorübergehenden Effekt auf den Azetylierungsstatus der Kernproteine in HT-29-, HepG2- und 23132/87-Zellen. Ein deutlicher Effekt auf die Azetylierung der HMG-N2- und H4-Proteine konnte nach 24 h abgelesen werden. Nach 48 h wurde jedoch kein deutlicher Effekt mehr hinsichtlich des Azetylierungsstatus der HMG-N2- und Histon H4-Proteine in den untersuchten Zellen im Vergleich zur Kontrolle inkubierter Zellen festgestellt (*Abb. 12 - 14*).

3.3.1. HDAC-Effekt auf Histon- und Nichthiston-Proteine in HT-29-Zellen

Effekt des HDAC-Inhibitors auf die Azetylierung von Histon- und Nichthiston-Proteinen in HT-29-Zellen: Nach zeit- und dosisabhängiger Inkubation der Zellen mit Butyrat bzw. Trichostatin wurde die Azetylierung des Histonproteins H4 und des Nichthiston-Proteins HMG-N2 mittels Western-Blots mit spezifischen Antikörpern analysiert.

Abb. 12

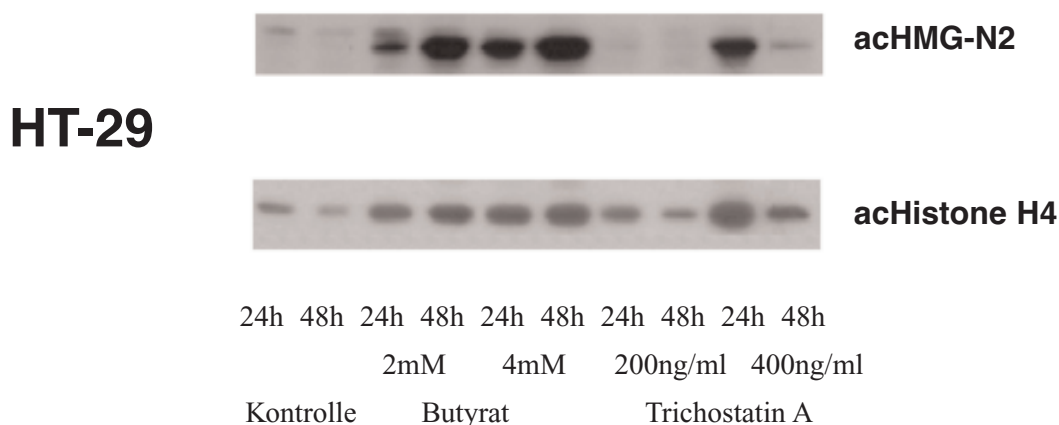


Abb.12. Western-Blot HT-29-Zellen

3.3.2. HDAC-Effekt auf Histon- und Nichthiston-Proteine in HepG2-Zellen

Effekt des HDAC-Inhibitors auf die Azetylierung von Histon- und Nichthiston-Proteinen in HepG2-Zellen: Nach zeit- und dosisabhängiger Inkubation der Zellen mit Butyrat bzw. Trichostatin wurde die Azetylierung des Histonproteins H4 und des Nichthiston-Proteins HMG-N2 mittels Western-Blots mit spezifischen Antikörpern analysiert.

Abb. 13

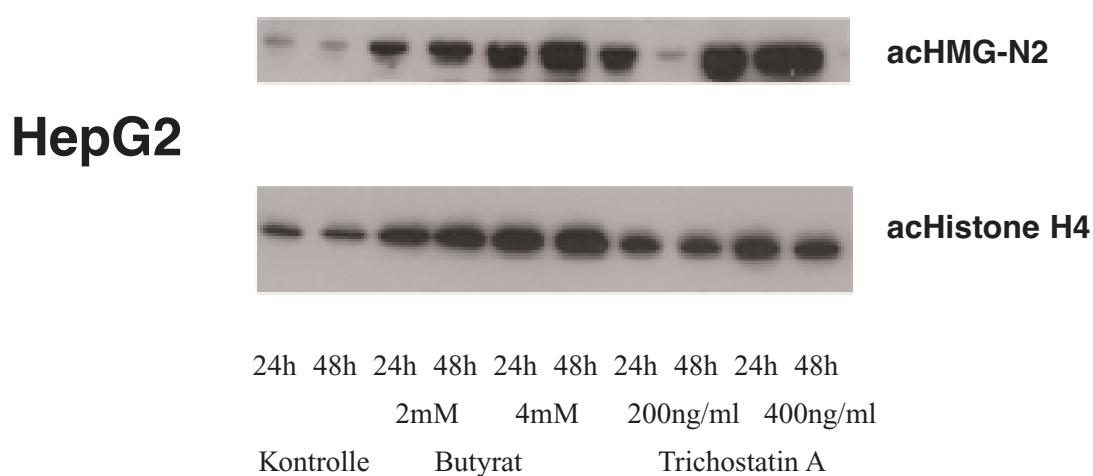


Abb.13. Western-Blot HepG2-Zellen

3.3.3. HDAC-Effekt auf Histon- und Nichthiston-Proteine in SC-1-Zellen

Effekt des HDAC-Inhibitors auf die Azetylierung von Histon- und Nichthiston-Proteinen in 23132/87-Zellen: Nach zeit- und dosisabhängiger Inkubation der Zellen mit Butyrat bzw. Trichostatin wurde die Azetylierung des Histonproteins H4 und des Nichthiston-Proteins HMG-N2 mittels Western-Blots mit spezifischen Antikörpern analysiert.

Abb. 14

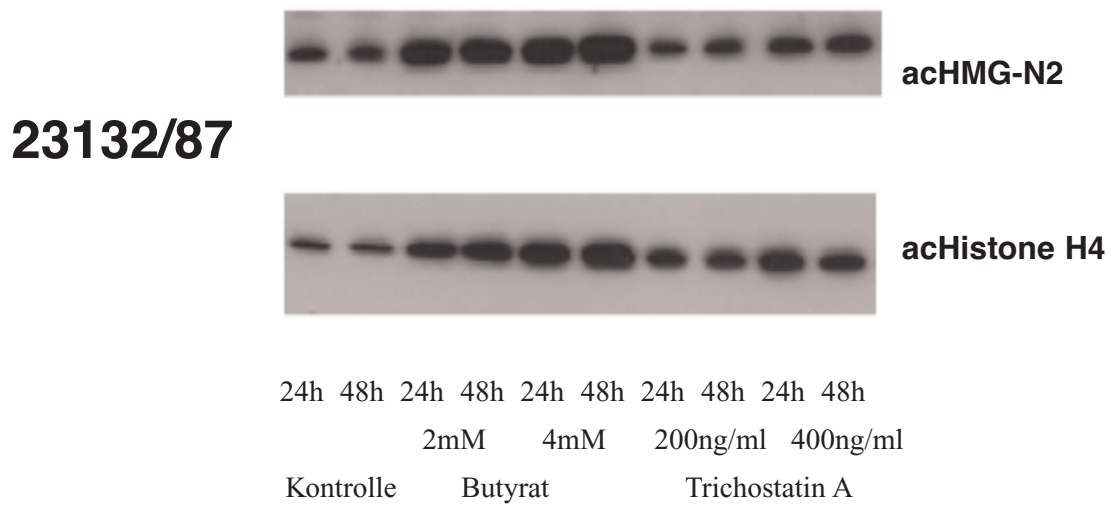


Abb.14. Western Blot 23132/87-Zellen

3.4. Der Einfluss des MEK-ERK-Signalweges auf die HDAC induzierte LL-37 Expression in Kolon-, Magen- und hepatozellulären Karzinomzellen

Um herauszufinden, ob die durch Butyrat regulierte Expression des Cathelizidins LL-37 einer gemeinsamen Signalkaskade folgt, wurden die zu untersuchenden Zellen mit dem spezifischen MEK-ERK-Inhibitor UO126 inkubiert. Dabei wurde die Butyrat induzierte LL-37 Genexpression in HT-29-Zellen durch die Inhibition des MEK-ERK-Signalweges geblockt (*Abb.15*). Bei den 23132/87-Magenzellen blockte die Vorinkubation mit UO126 die Butyrat induzierte LL-37 Genexpression nach 24 h. Hingegen konnte kein Effekt nach 48 h ermittelt werden (*Abb. 16*). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen hatte die Blockade des MEK-ERK-Signalweges keinerlei Effekt auf die LL-37 Expression in HepG2-Leberkarzinomzellen (*Abb. 17*).

3.4.1. Einfluss des MEK-ERK-Signalweges auf die LL-37-Genexpression in HT-29-Kolonzellen

In HT-29-Zellen fiel die Induktion der LL-37 Transkription durch die Vorbehandlung des MEK-ERK-Inhibitors bei einer Butyratkonzentration von 2 mM nach 24 Stunden von einer etwa 1,45-fachen auf eine 1,36-fache Induktion. Noch deutlicher wird der Unterschied nach 48 Stunden, wo ein Abfall der etwa 9,5-fachen auf die 3,6-fache Induktion beobachtet werden konnte.

Abb. 15

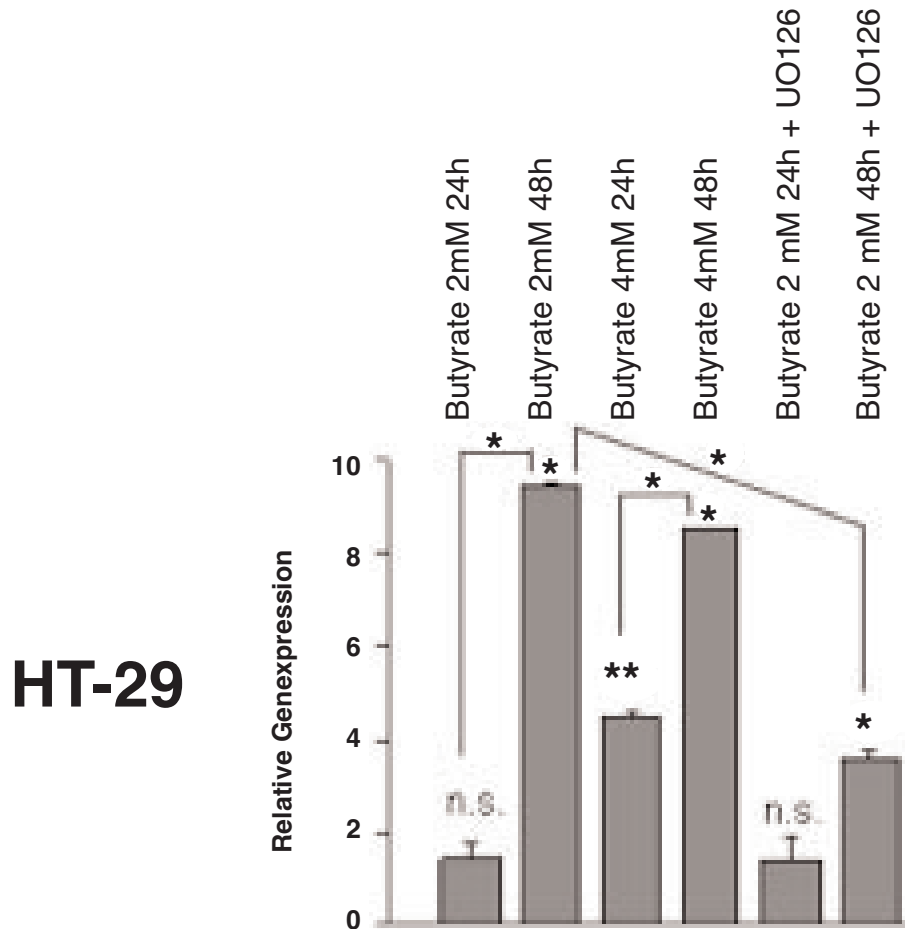


Abb.15. HT-29-Kolonzellen wurden mit Butyrat (2 mM und 4 mM) für bis zu 48 Stunden inkubiert und mittels Real-Time-PCR analysiert. Zusätzlich wurde der Effekt des MEK-ERK-Inhibitors UO126 auf die Butyrat-induzierte LL-37 Expression analysiert. Die Induktion der LL-37 Transkription ist als relative Genexpression zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt.

(n.s.: nicht signifikant; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,001$).

3.4.2. Einfluss des MEK-ERK-Signalweges auf die LL-37-Genexpression in 23132/87-Magenzellen

In den 23132/87-Magenzellen konnte ein deutlicher Abfall von einer ca. 39-fachen auf eine 17-fache Induktion der LL-37 Transkription nach 24 Stunden mit 2 mM Butyratinkubation durch die Vorbehandlung mit UO126 gezeigt werden. Nach 48 Stunden erfolgte keine weitere Blockade, und die Werte stiegen von einer etwa 53-fachen auf eine 69-fache Induktion an.

Abb. 16

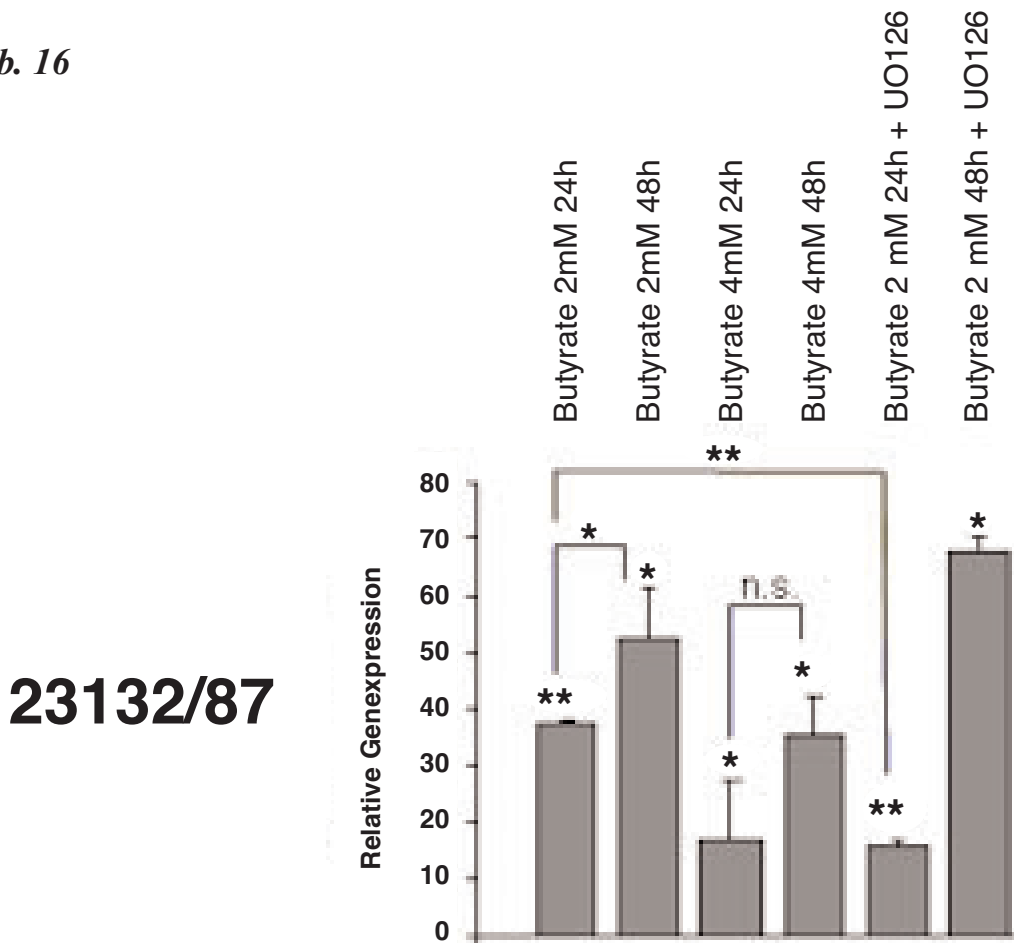


Abb.16. 23132/87-Magenzellen wurden mit Butyrat (2m M und 4 mM) für bis zu 48 Stunden inkubiert und mittels Real-Time-PCR analysiert. Zusätzlich wurde der Effekt des MEK-ERK-Inhibitors UO126 auf die Butyrat-induzierte LL-37 Expression analysiert. Die Induktion der LL-37 Transkription ist als relative Genexpression zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt.

(n.s.: nicht signifikant; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,001$).

3.4.3. Einfluss des MEK-ERK-Signalweges auf die LL-37-Genexpression in HepG2-Leberzellen

Bei den HepG2-Zellen ergab sich bei der Inkubation mit 2 mM Butyrat nach 24 Stunden ein etwa 47-facher Anstieg der LL-37 Induktion und mit UO126 ein etwa 33-facher. Nach 48 Stunden stieg die Induktion von einer etwa 145-fachen auf eine 156-fache Induktion.

Abb. 17

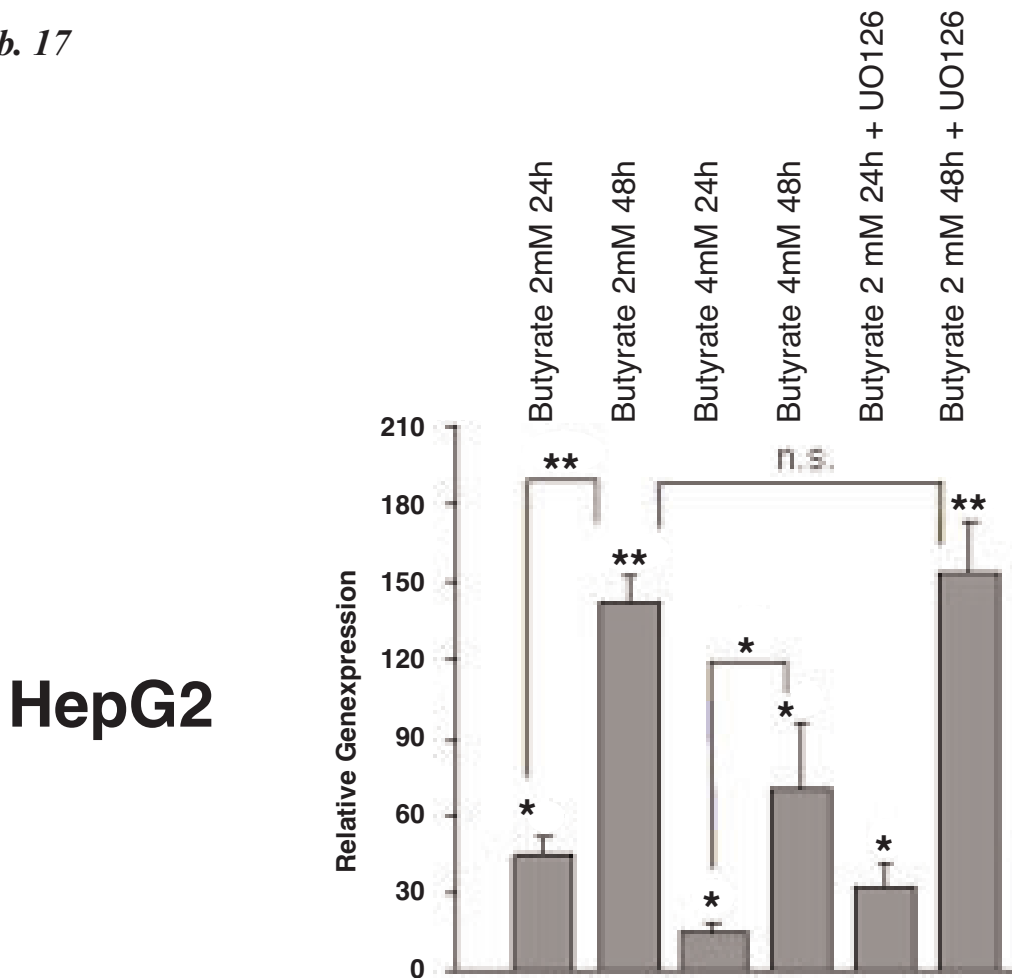


Abb.17. HepG2-Leberzellen wurden mit Butyrat (2 mM und 4 mM) für bis zu 48 Stunden inkubiert und mittels Real-Time-PCR analysiert. Zusätzlich wurde der Effekt des MEK-ERK-Inhibitors UO126 auf die Butyrat-induzierte LL-37 Expression untersucht. Die Induktion der LL-37 Transkription ist als relative Genexpression zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt.

(n.s.: nicht signifikant; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,001$).

4. Diskussion

Cathelizidine sind als antimikrobielle Peptide wichtige Effektor-moleküle der angeborenen Immunabwehr mit direktem Effekt auf verschiedene Pathogene (Ziaou und Gallo 2002). Besonders wichtig ist ihre Funktion in mukosalen Oberflächen, wo sie eine der ersten Barrieren gegen eindringende Erreger darstellen (Ayabe, Satchell, et. al. 2000; Ganz 1999). Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten ist vieles über die Expression und Regulation der antimikrobiellen Peptide noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass gastrointestinale Karzinomzellen im Unterschied zu untransformierten Kolonepithelzellen das Cathelizidin LL-37 nicht exprimieren. Weiterhin ergab die Untersuchung der HDAC-Inhibitoren Butyrat und Trichostatin in Verbindung mit LL-37 eine Steigerung der Genexpression des antimikrobiellen Peptids durch diese Substanzen. Dies wurde an Kolon-, Magen- und hepatozellulären Zelllinien beobachtet. Die Genexpressionssteigerung war hierbei zeit- und dosisabhängig. Es ließ sich im Vergleich von Butyrat und dem synthetisch hergestellten Trichostatin ein nur transienter Effekt durch Trichostatin bewirken, wohingegen der Butyrateffekt anhaltend war. Weiterhin konnte erstmals eine Assoziation dieser Vorgänge mit einer Veränderung im Azetylierungsstatus der Kernhiston- und Nichthistonproteine nachgewiesen werden. Wiederum wurde hier ein nur transienter Effekt auf den Azetylierungsstatus von HMG-N2 und Histon H4 für Trichostatin im Gegensatz zu Butyrat beobachtet. Zuletzt sollte noch die Rolle des MEK-ERK-Signalweges, der durch eine Reihe verschiedener extrazellulärer Stimuli aktiviert wird, untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der MEK-ERK-Signalweg an der HDAC-induzierten Steigerung der LL-37 Expression in Zellen des Kolons und des Magens beteiligt ist. Diese Beobachtungen können die Grundlage für eine pharmakologische Beeinflussung der Expression antimikrobieller Peptide bilden. Eine Stärkung der Barrierefunktion der gastrointestinalen Mukosa durch eine erhöhte Expression antimikrobieller Peptide, wie LL-37, stellt eine neuartige Option in der Therapie oder Prävention von Infektionen dar.

4.1. Expression und Funktion des antimikrobiellen Peptids LL-37

Antimikrobielle Peptide als Abwehrmechanismen sind omnipräsent. Sie erfüllen eine elementare Rolle im Immunabwehrmechanismus von Pflanzen, Insekten und Tieren (Zasloff, Nature 2002). Cathelizidine und Defensine sind die zwei Hauptgruppen antimikrobieller Peptide bei Säugetieren, wobei das Cathelizidin LL-37 das bisher einzig bekannte Cathelizidin des menschlichen Organismus darstellt. Es wurde erstmals in Neutrophilen identifiziert (Sorensen, Arnljots, et. al. 1997). Später konnte gezeigt werden, dass es in verschiedenen Plattenepithelien (Frohm, Sandstedt, et. al. 1999), im Oberflächenepithel der Luftwege und in serösen sowie mukösen Zellen der submukosalen Drüsen, exprimiert wird (Bals, et. al. 1998). Desweiteren konnte eine Expression von LL-37 durch Keratinozyten entzündeter Haut (Frohm, et. al. 1997) und spezifischer Lymphozyten- und Monozytenpopulationen (Agerberth, et. al. 2000) bewiesen werden. Das Expressionsmuster des antimikrobiellen Peptids LL-37 macht dessen Rolle in der Barrierefunktion, speziell bei mit der Umwelt in Verbindung stehender Systeme und als effektiver „First-Line“-Abwehrmechanismus, deutlich. Insbesondere der Gastrointestinaltrakt profitiert von der Anwesenheit antimikrobieller Peptide. Bereits bekannt ist, dass die Expression des humanen Defensins 5 und 6 auf die Panethschen Körnerzellen des Dünndarm beschränkt ist, während die humanen antimikrobiellen Peptide LL-37 und β -Defensin-1 im wesentlichen in Kolonepithelzellen konstitutiv exprimiert werden (O'Neil, Porter, et. al. 1999; Cunliffe, Rose, et al. 2001). Das humane β -Defensin-2 andererseits wird durch Entzündungsmediatoren und als Antwort auf bakterielle Infektion induziert (O'Neil, Porter, et. al. 1999). In der vorliegenden Studie wurde die Expression und Regulation des Cathelizidins LL-37 in humanen gastrointestinalen Zellen untersucht.

Mittels immunhistochemischer Färbung von kolorektalen Karzinomzellen konnte hierbei keine LL-37 Peptidexpression nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte auch mittels Real-Time RT-PCR kein LL-37 Transkript in frisch isolierten kolorektalen Karzinomzellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in früheren Arbeiten unseres Labors in Kolonbiopsiematerial gesunder Individuen eine eindeutige LL-37 Expression, v.a. in den differenzierten Enterozyten des Dünn- und Dickdarms, gezeigt werden. Auch aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass LL-37 durch

Kolonepithelzellen exprimiert wird (Hase, Eckmann, et. al. 2002; Islam, Bandholtz, et. al. 2001). Ein wesentlicher Faktor der LL-37 Expression scheint hierbei der Differenzierungsstatus der untersuchten Zellen zu sein (Hase, Eckmann, et. al. 2002; Schaubert, Svanholm, et. al. 2003). Die weiteren Untersuchungen in vitro ließen auch in den hepatozellulären und gastralen Karzinomzellen nur geringe basale LL-37 Expressionslevels erkennen. Somit scheint durch die karzinomatöse Entartung der Epithelzellen auch ein Defizit in der Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 zu bestehen. Der Zusammenhang von LL-37 Expression und malignen Entartungen ist in neueren Studien bereits untersucht worden. So hat man beispielsweise bei Patienten, die an einer akuten myeloischen Leukämie (ALM) leiden, eine signifikante Reduktion der LL-37 Expression in den Neutrophilen entdeckt. Insbesondere waren hierbei die Patienten, die gerade an einer akuten Infektion litten, betroffen (An, Ma, et. al. 2005). Ein überraschendes Ergebnis brachte auch eine kürzlich veröffentlichte Studie hinsichtlich der Rolle von LL-37 bei Mamma Karzinom. Man fand eine starke Expression des antimikrobiellen Peptids in den Tumorzellen, nicht jedoch im angrenzenden Gewebe (Heilborn, Nilsson, et. al. 2005). Es zeigte sich eine scheinbare Korrelation zwischen Malignitätsgrad und der Expression von LL-37: die am höchsten differenzierten Tumore wiesen hierbei auch den stärksten Anstieg der LL-37 Produktion auf. Weiterhin zeigte sich eine durch LL-37 gesteigerte Proliferation der Zellen was eine Förderung des Tumorwachstums durch LL-37 nahe legen könnte (Heilborn, Nilsson, et. al. 2005). Hatte man antimikrobiellen Peptiden, einschließlich der Cathelizide, eine Rolle in der nichtspezifischen Abwehr von Tumoren zugesprochen (Winder, Gunzburg, et. al. 1998; Ohtake, Fujimoto, et. al. 1999), scheint diese Studie diese Hypothese klar zu widerlegen. Jedoch stimmt sie mit früheren Ergebnissen überein, bei denen eine mögliche Modulation der Progression von Nierenzelltumoren durch humanes α -Defensin postuliert wurde (Müller, Markovic-Lipkovski, et. al. 2002).

Die Rolle der antimikrobiellen Peptide als wichtiger Faktor in der Immunabwehr vieler Organismen wie z.B. Pflanzen, Insekten, Bakterien und Wirbeltieren ist seit längerem unbestritten (Lehrer, Ganz, et. al. 1999; Boman, 1998; Zanetti, Gennaro, et. al. 1997). Um die Wichtigkeit auch in vivo nachzuweisen, konnte an Cathelizidin-Gen CRAMP Knockout-Mäusen eine deutlich erhöhte Anfälligkeit gegenüber invasiven Hautinfektionen nachgewiesen werden (Nizet, et. al. 2001). Als weiteres Beispiel wurde mittels Gentransfer des antimikrobiellen Peptids LL-37 auf Mäuse eine

deutliche Verstärkung der eigenen Immunabwehr gegen *Pseudomonas*-*infektion*, *E-coli*-Infektion und sogar nach Injektion von LPS erzielt (Bals, Weiner, et. al. 1999). Auch der eindrückliche Zusammenhang von LL-37-Defizienz bei an Mb. Kostmann erkrankten Patienten und deren Immunschwäche (Pütsep, Carlsson, et. al. 2002) ist ein Beispiel für den entscheidenden Beitrag des antimikrobiellen Peptids in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungsmuster des Menschen. Eine weitere tragende Rolle kommt dem Peptid in Hauterkrankungen zu. Beispielsweise wurde bei der Atopischen Dermatitis ebenfalls ein Defizit des antimikrobiellen Peptids LL-37 nachgewiesen (Ong, Ohtake, et. al. 2002). Trotz all der in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die Vielseitigkeit und Wichtigkeit der antimikrobiellen Peptide im menschlichen Organismus ist immer noch wenig über den molekularen Mechanismus der LL-37 Regulation bekannt.

4.2. Modulation und Regulation des antimikrobiellen Peptids LL-37 durch Butyrat und TSA

Kurzkettige Fettsäuren sind in vielerlei Hinsicht bereits Gegenstand ausführlicher Forschungsarbeiten gewesen. Durch Fermentation von unverdauten Kohlenhydraten stellen anaerobe Bakterien der gesunden Kolonflora kurzkettige Fettsäuren, wie u.a. Butyrat, her. Während Butyrat in normalen Epithelzellen den bevorzugten oxidativen Brennstoff darstellt und das Wachstum stimuliert (Wachtershauser, Stein 2000; Scheppach 1994), inhibiert es die Proliferation und induziert die Zelldifferenzierung in Kolonkarzinomzellen (Scheppach 1994; Velazquez, Lederer, et. al. 1996, Wachtershauser, Steinhilber, et. al. 2000). Viele der Effekte von Butyrat werden mit seiner Fähigkeit von Veränderungen im Nukleolus in Verbindung gebracht. Hier spielt vor allem die Hyperazetylierung von Kernhiston wohl eine der wichtigsten Rollen. Durch eine nichtkompetitive, reversible Inhibition der Histondeazetylase bewirkt Butyrat die Hyperazetylierung bestimmter Kernhistone. Auf diese Weise kann Butyrat in die Regulation der Gentranskription eingreifen (Habbes, Thorne, et. al. 1988; Sealy, Chalkley 1978). So zeigten einige Arbeiten, dass Zellen einer akuten promyeloischen Leukämie, Erythroleukämische Zellen und auch Kolonepithelzellen durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren oder durch die Blockierung der HDAC-Aktivität durch HAT zur terminalen Differenzierung übergehen können (Pecanha, Snapper, et. al. 1991; Gelmetti, Zhang, et. al. 1998; Yoshida, Nomura, et. al. 1987; Siavoshian, Segain, et. al. 2000; Richon, Emiliani, et. al. 1998). Ein jüngerer Bericht demonstriert die Aktivierung

der terminalen B-Zell-Differenzierung durch HDAC-Inhibitoren TSA und Butyrat (Lee, Bottaro, et. al. 2003). Die Butyratwirkungen, die auf Histonhyperazetylierung zurückgeführt werden können, können durch einen Vergleich mit TSA beurteilt werden (Yoshida, Kijima, et. al. 1990). Im Gegensatz zu Butyrat ist die Hyperazetylierung durch TSA allerdings nur transient (Wu, Archer, et. al. 2001). Dies konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die HDAC-Inhibitoren Butyrat, TSA und auch Propionat die LL-37 Expression in Kolonepithelzellen modulieren (Schauber, Svanholm, et. al. 2003; Hase, Eckmann, et. al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse mittels Real-Time RT-PCR Untersuchungen nun auf andere gastrointestinale Zellen, wie Magen- und hepatozelluläre Zelllinien, erweitert werden.

Die im Kolonlumen physiologisch vorkommende Butyratkonzentration schwankt zwischen 13 mM und 19 mM (Cummings 1981). Es können jedoch auch Spitzenwerte bis zu 40 mM vorkommen (Scheppach 1994). Die von uns verwendeten Butyratkonzentrationen lagen zwischen 2 mM bis maximal 4 mM und somit unter dem physiologisch vorkommenden Spiegel. Dennoch kann beispielsweise durch das Fehlen einer in vivo vorliegenden, luminalen Mukusschicht mit einer verstärkten Butyratwirkung gerechnet werden (Hague, Singh, et. al. 1997). Um eine toxische Wirkung auf die Zellen zu vermeiden, blieb unsere Inkubationszeit, in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen, auf maximal 48 Stunden beschränkt (Hague, Singh, et. al. 1997; Hague, Diaz et al. 1997). Nachdem Butyrat bekanntermaßen ein potenter Apoptoseinduktor ist, muss natürlich auch ausgeschlossen werden, dass die Steigerung der LL-37 Expression nicht nur Folge einer vermehrten Zellapoptose darstellt. Dies wurde bereits in vorherigen Arbeiten untersucht und ausgeschlossen (Schauber, Svanholm, et. al. 2003). Desweiteren hat man sich bei diesen Untersuchungen an die Beurteilung der adhärent wachsenden Zellen gehalten. Es gilt als bekannt, dass die adhärent wachsenden Zellen in den Zellkulturflaschen sich lösen sobald sie apoptotisch werden. Sie schliefen in das Kulturmedium ab und stellen die flotierende Zellfraktion dar (Heerdt, Houston, et. al. 1994). Die apoptotischen Zellen im Zellkulturmedium wurden bei unseren Untersuchungen verworfen.

In Experimenten mit HepG2-, HT-29- und 23132/87-Zellen konnten wir jeweils eine, durch Inkubation mit dem HDAC-Inhibitor Butyrat ausgelöste, Steigerung der Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 beobachten. Die Induktion der LL-37 Expression war zeit- und dosisabhängig und von unterschiedlicher Ausprägung in den unterschiedlichen Gewebstypen. Zum Vergleich wurde eine Stimulation derselben Zelltypen mit TSA vorgenommen. Auch hier konnte ein signifikanter Effekt auf die LL-37 Expression in allen drei Zelllinien festgestellt werden. Allerdings war der TSA- Effekt nur transient. Während nach 24 Stunden ein signifikanter Effekt zu sehen war, war der Effekt nach 48 Stunden bei niedriger TSA-Konzentration in allen drei Zellen nicht mehr signifikant. Auch führte eine verlängerte Inkubationszeit bei TSA, im Gegensatz zu Butyrat, generell kaum zu einer erhöhten Expression von LL-37. Butyrat konnte alles in allem einen stärkeren Einfluss auf die LL-37 Expression ausüben. In der Untersuchung des Effektes von Butyrat und TSA auf die Proliferation und Differenzierung von HT-29-Zellen konnte ebenfalls ein deutlicher Unterschied bezüglich der Hyperazetylierungsdauer von H4 beobachtet werden (Siavoshian, Segain, et. al. 2000). TSA führte im Vergleich mit Butyrat nur zu transienten Effekten. In einer anderen Veröffentlichung konnte explizit nachgewiesen werden, dass ein dauerhafter Effekt auf die Hyperazetylierung von Histon nur durch Butyrat oder durch wiederholte Dosen von TSA erreicht werden konnten. Einzeldosen TSA erzielten auch hier nur einen transienten Effekt (Wu, Archer, et. al. 2001).

Der hier beobachtete Zusammenhang von HDAC-Inhibitoren und Modulation von antimikrobiellen Peptiden könnte ein Anstoß zur Hinterfragung bereits vorliegender Studienergebnisse sein. So gibt es interessanterweise eine Untersuchung, die belegt, dass die Expression antimikrobieller Peptide, so auch LL-37, während einer *Shigella*-Infektion reduziert ist oder sogar komplett ausgeschaltet wird (Islam, Bandholtz, et. al. 2001). In einer anderen Untersuchung konnte bei einer *Shigella*-Infektion von Kaninchen eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome durch topische Behandlung mit einer Mixtur aus HDAC-Inhibitoren erzielt werden. Desweiteren zeigte sich eine Reduktion der Anzahl von Bakterien im Kolon und eine deutliche Besserung histologischer Veränderungen der Kolonschleimhaut (Rabbani, Albert, et. al. 1999). Dennoch steht der Nachweis eines direkten Zusammenhangs einer Steigerung der Expression von epithelialen antimikrobiellen Peptiden mit der klinischen Beobachtung noch aus. Auch bleibt noch zu testen, ob

HDAC-Inhibitoren auch eine effektive Behandlungsmöglichkeit für Krankheiten, die mit einer Verminderung von antimikrobiellen Peptiden einhergehen, darstellen. Solche Krankheiten sind Hauterkrankungen wie die atopische Dermatitis (Ong, Ohtake, et.al. 2002) oder auch die schwerwiegende kongenitale Neutropenie, der Morbus Kostmann (Pütsep, Carlsson, et. al. 2002). Ein weiterer möglicher Ansatz sind entzündliche Darmerkrankungen. Es ist gezeigt worden, dass die Pathogenese der Colitis Ulcerosa mit einem Defekt im Butyratmetabolismus vergesellschaftet ist (Roediger, 1995; Scheppach, Bartram, et. al. 1995). Auch hier könnte durch die Butyratzufuhr die Expression von LL-37 wieder vermehrt induziert werden und somit ein therapeutischer Ansatz bestehen.

4.3. Der Effekt von Butyrat und TSA auf die Modulation von Histon- und Nichthiston-Proteinen in HT-29-, HepG2- und 23132/87-Zellen

Veränderungen in der Chromatinstruktur durch Modifikation von Histon scheinen eine zentrale Rolle in der Regulation der Gentranskription zu spielen. In einem vor kurzem veröffentlichten Bericht konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit der kurzkettigen Fettsäure Butyrat in HT-29-Zellen mit einer Azetylierung des Nichthiston- Proteins HMG-N2 vergesellschaftet ist. Weiterhin zeigt sich in dieser Untersuchung, dass die Behandlung mit Butyrat die Verteilungs- und Bindungseigenschaften von HMG-N2 an Chromatin beeinflusst (Lührs, Hock, et. al. 2002). Dies wiederum könnte das HMG-N2 Chromatin-Bindungs-Pattern verändern und dadurch Einfluss auf die Transkription und Expression spezifischer Gene nehmen. Beispielsweise ist auch belegt worden, dass die Azetylierung des HMG-Proteins durch den Transkriptions-Coaktivator CBP notwendig ist, um die Genexpression von Interferon- β auszuschalten (Munshi, Merika, et. al. 1998). Butyrat und TSA beeinflussen insbesondere die Azetylierung von Kernhiston H3 und H4 (Sealy and Chalkeley 1978; Siavoshian, Segain, et. al. 2000). Man nimmt an, dass diese Hyperazetylierung der Kernhistone zu einer Separation von Histon und DNA führt und so ebenfalls in der Aktivierung bestimmter Gene mündet (Fujii, Luo, et al. 2003; Grunstein 1997). Mit unseren Untersuchungen wollten wir einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Azetylierungsstatus des Nichthistonproteins HMG-N2 und des Kernhistonproteins H4 und der Expression des

antimikrobiellen Peptids LL-37 durch HDAC-Inhibitoren nachweisen. In HT-29-Kolon-, HepG2-Leber-, sowie 23132/87-Magenzellen konnte eine zeit- und dosisabhängige Azetylierung von HMG-N2 und H4 durch Butyrat beobachtet werden. Hierbei war der Effekt durch Butyrat, ähnlich der Ergebnisse der Real-Time RT-PCR Untersuchungen, anhaltend. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die totale Proteinkonzentration von HMG-N2 nach Inkubation mit Butyrat konstant bleibt (Lührs, Hock, et. al. 2002). Dies lässt darauf schließen, dass nicht der intrazelluläre Proteinlevel, sondern eher die Veränderung der Proteinmodifikation dafür verantwortlich ist, wie HMG-N2 die Chromatinstruktur verändert und beeinflusst. TSA wurde auch hier als Vergleichssubstanz eingesetzt. Es induzierte ebenfalls eine Azetylierung von HMG-N2 und H4 in allen drei Zelllinien. Wie auch bei den RT-PCR-Untersuchungen konnte TSA allerdings auch hier nur einen transienten Effekt ausüben. Zusammenfassend konnte ein Zusammenhang zwischen dem Azetylierungsstatus der Kernhiston- und Nichthistonproteine und der Induktion der Expression von LL-37 in den untersuchten Zelllinien beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich zum Teil mit denen anderer Forschungsgruppen. Bei einer Untersuchung bezüglich des Effektes von TSA auf Apoptose und Differenzierung in humanen hepatozellulären Karzinomzellen steigerte TSA eindeutig die Azetylierung von H3 und H4 Kernhistonproteinen in HepG2-Zellen (Yamashita, Shimada, et. al. 2003). Auch in HT-29 Zellen wurde, wie bereits oben erwähnt, durch Butyrat und TSA eine Steigerung im Azetylierungsstatus von Histon H4 beobachtet, ebenfalls nur transient für TSA (Siavoshian, Segain, et. al. 2000).

Der Zusammenhang von Veränderungen im Azetylierungsstatus von Kernhiston- und Nichthistonproteinen durch HDAC-Inhibitoren und dadurch hervorgerufene Veränderungen der Genexpression oder Transkription von Genen wurde in anderen Arbeiten aufgezeigt. Einige Studien deuten darauf hin, dass die durch Histonhyper- und -Deazetylierung veränderte Nukleosomstruktur eine wichtige Rolle bei der Änderung von Genexpressionsmustern und somit konsequenterweise bei der Entstehung oder Suppression von Krebs spielen (Archer, Hodin 1999; Alland, Muhle, et. al. 1997; Hassig, Fleischer, et. al. 1997). Neben Kernhistonproteinen sind auch bei Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel p53 (Sakaguchi, Herrera, et. al. 1998; Liu, Scolnick, et. al. 1999) oder Nichthiston-Proteinen wie HMG-A1/A2 (Munshi, Merika, et. al. 1998) oder HMG-N1 und HMG-N2

(Herrera, Sakaguchi, et. al. 1999; Bergel, Herrera, et. al. 2000) Zusammenhänge mit dem Azetylierungsstatus dieser Proteine untersucht worden. In allen Fällen wurde ein eindeutiger Effekt der Azetylierung auf Veränderungen in der Genexpression beobachtet.

4.4. Die Rolle des MEK-ERK-Signalweges

Die MEK-ERK Signalkaskade ist der Prototyp der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPKs). Sie hat unter anderem eine tragende Rolle bei der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung (Seger, Krebs, 1995; Wilkinson, Millar 2000) und könnte demnach auch in die Regulation antimikrobieller Peptide eingreifen. Beispielsweise scheint die Proliferation und das Überleben haematopoetischer Zellen wesentlich auch über die Aktivierung der MEK-ERK-Signalkaskade reguliert zu werden (Miranda, Mcguire, et. al. 2002). Andererseits hat sich gezeigt, dass die ERK Inhibition das Zellwachstum und auch die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Gentranskription hemmt (Sowa, Orita, et. al. 1997; Sowa, Orita, et. al. 1999). Desweiteren sind Zusammenhänge des MEK-ERK-Signalweges mit den Effekten von Butyrat gezeigt worden. HDAC-Inhibitoren, wie Butyrat, sind an der Induktion von Differenzierung in Kolonepithelzellen und hepatozellulären Zellen beteiligt (Siavoshian, Segain, et. al. 2000; Yamashita, Shimada, et. al. 2003). Die durch Butyrat induzierte Differenzierung von intestinalen Epithelzellen ist mit einer Modulation des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges vergesellschaftet (Ding, Wang, et. al. 2001; Witt, Schulze, et. al. 2001, Davido, Richter, et. al. 2001). Eine andere Arbeit zeigte, dass die Transkription des $G\alpha_{i2}$ -Gen Promotor über Butyrat und TSA induziert wurde und der MEK-ERK-Signalweg hierbei beteiligt ist. Zusätzlich fand diese Arbeitsgruppe, dass eine SP1-Bindungsstelle diesen Effekt vermittelt (Yang, Kawai, et. al. 2001). Bisher konnte keine SP1-Bindungsstelle in LL-37 Promotorregion gefunden werden. Es könnten jedoch auch andere Transkriptionsfaktoren in die Aktivierung des MEK-ERK- Signalweges involviert sein. Vor kurzem postulierte eine Forschungsgruppe, dass der intestinale Homeobox Transkriptionsfaktor Cdx2 in Kolonepithelzellen durch Butyrat stimuliert wird (Domon-Dell, Wang, et. al. 2002). Dieser Transkriptionsfaktor ist ein wichtiger Regulator der Proliferation, Morphogenese und Genexpression im Darmepithel (Suh, Traber 1996). In der Promotorregion von LL-37 und hCAP18 ist eine

mögliche Bindungsstelle für Cdx2 vorhanden (Hase, Eckmann, et. al. 2002). Auch ist bereits bekannt, dass die chemotaktische Wirkung von LL-37 gegenüber Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten über den Formly Peptide Rezeptor-Like1 (FPRL1) und eine nachfolgende G-Protein-Kaskade vermittelt wird (Niyonsabe, Iwabuchi, et. al. 2002). Die Fähigkeit zur Angiogenese von LL-37 und seinen hierdurch positiven Einfluss auf die Wundheilung und Gewebereparation ist ebenfalls über den FPRL1-Rezeptor vermittelt (Kozulla, v. Degenfeld, et. al. 2003). Die Differenzierung von Kolonepithelzellen und die Induktion der LL-37 Expression wird über verschiedene Signalwege reguliert (Schauber, Svanholm, et. al. 2003). So war die p38/MAPK bei der Butyrat induzierten Zelldifferenzierung der Kolonzellen beteiligt, während der MEK-ERK-Signalweg in die LL-37 Expression involviert ist (Schauber, Svanholm, et. al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der MEK-ERK-Signalweg bei der durch HDAC-Inhibitoren vermittelten Steigerung der LL-37 Genexpression in anderen gastrointestinalen Epithelzellen beteiligt ist. Die Vorinkubation mit dem spezifischen MEK-ERK-Inhibitor UO126 blockte in Magen- und Kolonkarzinomzellen die durch Butyrat erhöhte Expression von LL-37. In den HepG2-Leberzellen konnte dieser Effekt allerdings nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass trotz der scheinbar vorhandenen Regulationsunterschiede von LL-37 in Geweben unterschiedlichen Ursprungs dennoch auch gemeinsame Regulationsmechanismen vorhanden sind. Interessanterweise wurde auch schon in der Regulation anderer antimikrobieller Peptide die Beteiligung des Raf-MEK-ERK-Signalweges gezeigt. So wird beispielsweise die Induktion des β -Defensins 2 durch proinflammatorische Stimuli in humanen Mittelohrepithelzellen auch über den MEK-ERK-Signalweg vermittelt (Moon, Lee, et. al. 2002).

5. Zusammenfassung

Zahlreiche epidemiologische und experimentelle Studien haben sich bereits mit der Wirkung der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auf kolorektale Epithelzellen beschäftigt. Der Gastrointestinaltrakt ist einer Vielzahl von endogenen und exogenen Noxen ausgesetzt. Es ist bekannt, dass Butyrat, neben ihrer Rolle als primärer Energielieferant des Kolonepithels, auch wichtige Effekte auf die Immunfunktion der Kolonmukosa ausüben.

Antimikrobielle Peptide sind kleine kationische Peptide, die von Epithelien gebildet werden und wie endogene Antibiotika wirken. Mittlerweile sind über 700 verschiedene antimikrobielle Peptide bekannt. So kennt man hier zehn humane Defensine (sechs α -Defensine (HNP 1 - 4, HD 5 - 6) und vier β -Defensine (HBD 1-4)) und das humane Cathelizidin LL-37. Diese Forschungsarbeit konzentriert sich auf die Expression und Regulation des humanen Cathelizidins. Es wird in den Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert und in Knochenmark, dem Hoden, Hautkeratinozyten, Lungenepithel, sowie dem Plattenepithel der Zunge, des Ösophagus sowie der Zervix und Vagina exprimiert. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu normalen Kolonepithelzellen, gastrointestinale Karzinomzellen das antimikrobielle Peptid LL-37 nicht exprimieren. Weiterhin wurde der Einfluss von Ernährungsfaktoren, wie Butyrat, auf die LL-37 Expression in gastrointestinalen Karzinomzellen untersucht. Es konnte eine durch Butyrat gesteigerte Expression des Peptids in Karzinomzellen aus Kolon-, Leber- und Magentumoren beobachtet werden. Da Butyrat auch ein Histondeazetylasehemmer ist, und als solcher auch Einfluss auf die Expression verschiedenster Gene nehmen kann, sollte nun noch untersucht werden, ob die Inhibierung von Histondeazetylase für die gesteigerte LL-37 Expression verantwortlich ist. Dazu wurden zum Vergleich Untersuchungen mit dem Histondeazetylasehemmer Trichostatin A angestellt. Dabei konnte eine Korrelation von LL-37 Induktion mit der Inhibition von Histondeazetylase und der damit verbundenen Modifikation von Kernproteinazetylierung beobachtet werden. Im Unterschied zum Butyrateneffekt, der bei allen Versuchen jeweils anhaltend war, zeigte sich bei Trichostatin ein transienter Effekt. Weiterhin konnte eine Blockade der durch die HDAC-Inhibitoren induzierten LL-37 Expression durch den spezifischen MEK-ERK-Inhibitor UO126 gesehen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression des Cathelidins LL-37 in verschiedenen gastrointestinalen Zellen durch HDAC-Inhibitoren moduliert wird. Dieser Vorgang wird vermittelt über den MEK-ERK-Signalweg und begleitet von Veränderungen im Azetylierungsstatus von Kernhiston- und Nichthistonproteinen. Dies legt einen gemeinsamen Regulationsmechanismus des antimikrobiellen Peptids LL-37 in gastrointestinalen Zellen nahe.

6. Literaturverzeichnis

Agerberth B., Charo, et. al. (2000). “The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha- defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations.”

Blood **96**:3086-93

Agerberth B., Gunne H., et. al. (1995). “Fall-39, a putative human peptide antibiotic, is cystein- free and expressed in bone marrow and testis.”

Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 195-99

Akira S., Takeda K., et. al. (2001). “Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.”

Nat Immunol **2**:675-80

Alland L., Muhle R., et. al. (1997). “Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression.”

Nature **387**:49-55

Alvila J. (1987). “Microtubule function.”

Life Sci **50**:327-33

An LL., Ma XT., et. al. (2005). “Marked reduction of LL-37/hCAP-18, an antimicrobial peptide, in patients with acute myeloid leukemia.”

Int. J. Hematol **81**:45-47

Archer S. J., Hodin R. A. (1999). “Histone acetylation and cancer.”

Curr Opin Genet Dev **9**:171-4. Review.

Ayabe T., Satchell D. P., et. al. (2000). “Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria.”

Nat Immunol **1**:113-18

Baba E., Nagaishi S., et. al. (1991). “The role of intestinal microflora on the prevention of Salmonella colonization in gnotobiotic chickens.”

Poultry Sci **70**:1902-07

Bagella L., Scocchi M., et.al. (1995). “cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins.”

FEBS Lett **376**:225-28

Bals R., Wang, et. al. (1998). “The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial at the airway surface.”

Proc Natl Acad Sci

Bals R., Lang C., et. al. (2001). “Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules.”

Clin Diagn Lab Immunol **8**:370-75

Bals R., Weiner D. J., et. al. (1999). “Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model.”

J Clin Invest **103**:1113-17

Banan A, Smith G.S., et. al. (1988). “Protection against ethanol injury by prostaglandins in a human intestinal cell line .”

J Physiol Gastrointest Liver Physiol **274**:G111-21

Bergel M., Herrera J. E., et. al. (2000). “Acetylation of novel sites in the nucleosomal binding domain of chromosomal protein HMG-14 by p300 alters its interaction with nucleosomes.”

J Biol Chem **275**:11514-11520

Bernet F.M., Brassart D., et. al. (1994). “*Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria.”

Gut **35**:483-89

Boffa K. C., Gruss R. J., et. al. (1981). “Manifold effects of sodium butyrate on nuclear function. Selective and reversible inhibition of phosphorylation of H1 and H2A and impaired methylation of lysine and arginine residues in nuclear protein fractions.”

J Biol Chem **256**:9612-21

Boman H. G., et. al. (1995). “Peptide antibiotics and their role in innate immunity.”

Annu Rev Immunol **13**:61-92

Boman H. G., et. al. (2000). “Innate Immunity and the normal microflora.”

Immunol Rev **173**:5-16

Boman H.G. (1998). “Gene- encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review.”

Scand J Immunol **48**:15-25

Boman H. G. (2003). “Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts.”

J. Int. Med. **254**:197-215

Boulton T. G., Nye S. H., et. al. (1991). “ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF.”

Cell **65**:663

Boulton T. G., Yancopoulos G. D., et. al. (1990). “An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control.”

Science **249**:64

Brandtzeag P., Baekkevold E. S., et. al. (1999). “Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?”

Immunology Today **20**(3):141-51

Brook I. (1999). “Bacterial interferences.”

Crit Rev Microbiol **25**:155-72

Bustin M., Lehn D. A., et. al. (1990). “Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes.”

Biochim Biophys Acta **1049**:231-43

Bustin M., Reeves R., et. al. (1996). “High-mobility-groups chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function.”

Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **54**:35-100

Cavaglieri C. R., Nishiyama A., et. al. (2003). “Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes.”

Life Science **73**:1683-90

Cowland J.B., A.H. Johnsen, et.al. (1995). “hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules.”

FEBS Lett **368**:173-76

Crippa M. P., Trieschmann L., et. al. (1993). “Deposition of chromosomal protein HMG-17 during replication affects the nucleosomal ladder and transcriptional potential of nascent chromatin.”

EMBO J **12**:3855-64

Cummings J. H. (1981). “Short chain fatty acids in the human colon .”

Gut **22**(9):763-79

Cummings J. H., Pomare E. W., et. al. (1987). “Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood.”

Gut **28**:1221-27

Cunliffe R, Rose F, et. al. (2001). “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 **48**:176-185

Davido D.J., Richter F, et. al. (2001). “Butyrate and propionate downregulate ERK phosphorylation in HT-29 colon carcinoma cells prior to differentiation.”

Eur. J. Cancer Prev. **10**(4):313-21

Davis R. J., et. al. (2000). “Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.”

Cell **103**:239-52

De Haan J.B., Gevers W., et. al. (1986). “Effects of sodium butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts.”

Cancer Res. **46**:713-16.

De Y., Chen Q., et. al. (2000). “LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formly peptide rezeptor-like 1 (FPRL1) as a rezeptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells.”

J Exp Med **192**:1069-74

De Silva D., Jones E. A., et. al. (1998). “Inhibition of mitogen- activated protein kinase kinase blocks T Cell proliferation but does not induce or prevent anergy.”

J. Immunol. **160**:4175-81

Derijard B., Hibi M., et al. (1994). “JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.”

Cell **76**:1025-37

Ding Q., Wang Q., et al. (2001). “Alteration of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation.”

Biochem Biophys Res Commun **284**:282-88

Domon-Dell C, Wang Q, et al. (2002). “Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells.”

Gut **50**(4):525-9

Dorschner R. A., Pestonjamas V. K., et al. (2001). “Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti- microbial peptides active against group A Streptococcus.”

J Invest Dermatol **117**:91-97

Frohm M., Agerberth, et al. (1997). “The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders.”

J Biol Chem **272**:15258-63

Frohm M., Gunne H., et al. (1996). “Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid.”

Eur J Biochem **237**:86-92

Frohm Nilsson M., Sandstedt, et al. (1999). “The human antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6.”

Infect Immun **67**:2561-66

Fujii S., Luo R. Z., et al. (2003). “Reactivation of the silenced and imprinted alleles of ARHI is associated with increased histone H3 acetylation and decreased histone H3 lysine 9 methylation.”

Hum Mol Genet. **12**:1791-800.

Gallo R.L., Kim K. J., et al. (1997). “Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse.”

J Biol Chem **272**:13088-93

Ganz, T., (1999). “Defensins and host defense.”

Science **286**:420-421

Gelmetti V., Zhang J., et. al. (1998). “Abberant recruitment of the nuclear receptor corepressor- histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO.”

Mol. Cell. Biol. **18**:7185-7191

Grunstein M., et. al. (1997). “Histone acetylation in chromatin structure and transcription.”

Nature (Lond) **389**:349-52

Gudmundsson G. H., Agerberth B., et. al. (1996). “The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes.”

Eur J Biochem **238**:325-32

Gudmundsson G.H., Magnusson K.P., et. al. (1995). “Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member : comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic FALL-39.”

Proc Natl Acad Sci U S A **92**:7085-89

Guo L., et. al. (1998). “Lipid A acetylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides.”

Cell **95**:189-98

Hague A, Diaz GD, et. al. (1997). “bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis.”

Int J Cancer. **72**(5):898-905

Hague A, Singh B, et. al. (1997). “Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells further fuel for the in vivo versus in vitro debate.”

Gastroenterology **112**(3):1036-40

Han J., Lee J.-D., et. al. (1994). “A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.”

Science **265**:808-11

Hase K., Eckmann L., et. al. (2002). “Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium.”

Infect. Immun. **70**:953-963

Hassig L. A., Fleischer T. C., et. al. (1997). “Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A.”

Cell. **89**:341-7.

Hebbes T. R., Thorne T. C., et. al. (1988). “A direct link between core histone acetylation to transcriptionally active chromatin.”

EMBO J **7**:1395-1402

Heerdt BG, Houston MA, et. al. (1994). “Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines.”

Cancer Res. **54**(12):3288-3293

Heilborn J. D., Nillson M. F., et. al. (2005). “Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells.”

Int. J. Cancer **114**: 713-19

Henzler Wildman K. A., Lee D.- K., et.al. (2003). “Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide LL-37.”

Biochem **42**:6545-58

Herrera J. E., Sakaguchi K., et. al. (1999). “Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes.”

Mol Cell Biol. **19**:3466-73.

Hoffmann J.A., Kafatos F. C., et. al. (1999). “Phylogenetic perspectives in innate immunity.”

Science **284**:1313-18

Islam D., Bandholtz L., et. al. (2001). “Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator.”

Nat. Med. **7**:180-85

Johansson J., Gudmundsson G. H., et al. (1998). “Conformation-dependant antibactetial activity of the naturally occuring human peptide LL-37.”

J Biol Chem **273**:3718-24

Kallunki T., Su B., et al. (1994). “JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation.”

Genes Dev **8**:2996-3007

Kirikae T., Hirata M., et al. (1998). “Protective effect of human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)- derived peptide against murine endotoxemia.”

Infect Immun **66**:1861-68

Koczulla R., v. Degenfeld G., et al. (2003). “An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37 /hCAP-18.”

J Clin Invest **111**:1665-72

Kruh J., et al. (1982). “Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture.”

Moll Cell Biochem **42**:65-82

Kyriakis J. M., Banerjee P., et al. (1994). “The stress-activated protein kinase subfamiliy of c-Jun kinases.”

Nature **369**:156-60

Larrick J. W., Hirata M., et al. (1995). “Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccheride-binding protein.”

Infect Immun **63**:1291-97

Larrick J.W., Morgan J.G., et al. (1991). “Complementary DNA sequence of rabbit CAP18-a unique lipopolysaccharid binding protein.”

Biochem Biophys Res Commun **179**:170-75

Lee S. C., Bottaro A., et al. (2003). “Activation of terminal B cell differentiation by inhibition of histone deacetylation.”

Mol Immunol. **39**:923-32.

Lee J. C., Laydon J. T.; et al. (1994). “A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.”

Nature **372**:739-46

Lehrer R.I., Ganz T., et. al. (1999). “Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence.”

Curr Opin Immunol **11**:23-27

Lievin V., Peiffer I., et. al. (2000). “Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity.”

Gut **47**: 646-52

Liu L., Scolnick D. M., et. al. (1999). “p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage.”

Mol. Cell. Biol. **19**:1202-1209

Lührs H., Hock R., et. al. (2002). “Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells.”

Int J Cancer **97**:567-73

Macfarlane G. T., Cummings J. H., et. al. (1991). “The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function.”

In: The Large Intestine: Physiol., Pathophysiol. and Disease. Eds: Phillips, Pemberton, et.al., Raven Press, New York: 51-92

Matsuo K., et. al. (1997). “Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon.”

Gut **40**:782-89

Matsuzaki K., et. al. (1999). “Why and how are peptide- lipid interactions utilized for self- defense?”

Biochim Biophys Acta **1462**:1-10

Mc Bain J. A., Eastman A., et. al. (1997). “Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors.”

Biochem Pharmacol **53**:1357-68

Mc Knight, G.S., Hager, L., et. al. (1980). “Butyrate and related inhibitors of histone deacetylation block the induction of egg white genes by steroid hormones.”

Cell **22** (2 (Pt 2)), 469-77

Minden A., Karin M., et. al. (1997). “Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases.”

Biochim Biophys Acta **1333**:F85-104

Miranda M. B., Mcguire T. F., et. al. (2002). “Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid celllines.”

Leukemia. **16**:683-92.

Moncada D.M., Kammanadiminti J., et. al. (2003). “Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites.”

TRENDS in Parasitology **19**:305-11

Moon S.-K., Lee H.- Y., et. al. (2002). “Activation of a Scr-dependent Raf- MEK1/2- ERK signalling pathway is required for IL-1 α -induced upregulation of β -defensin 2 in human middle ear epithelial cells.”

Biochem. Biophys. Acta **1590**:41-51

Mowat A. Mcl. (2003). “Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens.”

Nature Rev. Immunol. **3**:331-341

Müller C.A., Markovic-Lipkovski J., et. al. (2002). “Human alpha-defensins HNPs-1,-2, and-3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation.”

Am. J. Pathol. **160**:1311-24

Munshi N., Merika M., et. al. (1998). “Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome.”

Mol. Cell **2**:457-467

Nagaoka I., Tsutsumi-Ishii Y., et. al. (1997). “Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDA (CAP11) and evaluation of CAP11 mRNA expression during neutrophil maturation.”

J Biol Chem **272**:22742-50

Niyonsaba F., Iwabuchi K., et. al. (2002). “A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis.”

Immunology **106**:20-26

Nizet V., et. al. (2001). “An antimicrobial peptide protects mice from invasive bacterial infection.”

Nature **414**:454-57

Ohtake T., Fujimoto Y. et. al. (1999). “Proline-rich antimicrobial peptide, PR-39 gene transduction altered invasive activity and actin structure in human hepatocellular carcinoma cells.”

Br. J. Cancer **81**:393-403

O’Neil D. A., Porter, et. al. (1999), “Expression and regulation of the human beta- defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.”

J Immunol **163**:6718-24

Ong P. Y., Ohtake T., et. al. (2002). “Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis.”

N Engl J Med **347**:1151-60

Paranjape S. M., Krumm A., et. al. (1995). “HMG17 is a chromatin-specific transcriptional coactivator that increases the efficiency of transcription initiation.”

Genes Dev **9**:1978-91

Pecanha L. M., Snapper C. M., et. al. (1991). “Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T-cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion in vitro. I. Lymphokine dependence.”

J. Immunol. **146**:833.839

Pleschka S., Wolff T., et. al (2001). “Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/ MEK/ ERK signalling cascade.”

Nat Cell Biol **3**:301-07

Pütsep K., Carlsson G., et. al. (2002). “Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study.”

The Lancet **360**:1144-49

Rabbani G. H., Albert M. J., et. al. (1999). “Short-chain fatty acids improve clinical, pathologic, and microbiologic features of experimental shigellosis.”

J Infect Dis. **179**:390-07.

Richon V. M., Emiliani S., et. al. (1998). “A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases.”

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**:3003-3007

Riggs M. G., Whittaker R. G., et. al. (1977). “N-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells.”

Nature **268**:462-64

Roediger W. E. W., et. al. (1980). “Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man.”

Gut **21**:793-98

Roediger W. E. W., et. al. (1995). “The place of short-chain fatty acids in colonocyte metabolism in health and ulcerative colitis: the impaired colonocyte barrier.”

In: Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Eds: Cummings, Rombeau, Sakata, Cambridge University Press, Great Britain: 337-52

Rombeau J. L., Reilly K. J., et. al. (1995). “Short-chain fatty acids in intestinal surgery; rationale and clinical implications.”

In: Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Eds: Cummings, Rombeau, Sakata, Cambridge University Press, Great Britain: 401-25

Rouse J., Cohen P., et. al. (1994). “A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.”

Cell **78**:1027-37

Sakaguchi K., Herrera J. E., et. al. (1998). “DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade.”

Genes Dev. **12**:2831-2841

Schauber J., Svanholm C., et. al. (2003). “The expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short-chain fatty acids in colonocytes: Relevance of signalling pathways.”

Gut **52**:743-51

Scheppach W. (1994). “Effects of short-chain fatty-acids on gut morphology and function.”

Gut **35**:S35-S38

Scheppach W., Bartram P., et. al. (1995). “Management of diversion colitis, pouchitis and distal ulcerative colitis.”

In: Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Eds: Cummings, Rombeau, Sakata, Cambridge University Press, Great Britain: 353-60

Schmidtchen, A., Frick, I.-M., et. al. (2002). “Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37.”
Mol. Microbiology **46**(1):157-168

Scocchi M., Bontempo D., et. al. (1999). “Novel cathelicidins in horse leukocytes.”
FEBS Lett **457**:459-64

Sealy L and Chalkley R., et. al. (1978). “DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I.”
Nucleic Acids Res **5**:1863-76

Seger R., Krebs E. G., et. al. (1995). “The MAPK signalling cascade.”
FASEB J **9**:762-35

Shafer W. M., Qu X., et. al. (1998). “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 **65**:1829-33

Shamova O., Brogden K.A., et. al. (1999). “Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes.”
Infect Immun **67**:4106-111

Siavoshian S., Segain J. P., et. al. (2000). “Butarot and trichostatin A effects on the proliferation/ differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression.”
Gut **46**:507-514

Simhon A., Douglas JR., et. al. (1982). “Effect of feeding on infants’ faecal flora.”
Arch Dis Child **57**:54-58

Sluss H. K., Barrett T., et. al. (1994). “Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases.”
Mol Cell Biol **14**:8376-84

Sorensen, O., K. Arnljots, et. al. (1997). “The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils.”
Blood **90**:2796-2803

Sowa Y., Orita T., et. al. (1997). “Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promotor through the Sp1 sites.”

Biochem. Biophys. Res. Commun. **241**:142-150

Sowa Y., Orita T., et. al. (1999). “Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promotor through the Sp1 sites.”

Ann. N. Y. Acad. Sci. **886**:195-199

Sterner R., Vidali G., et.al. (1981). “Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins 14 and 17.”

J Biol Chem **256**:8892-95

Storici P., Scocchi M., et. al. (1994). “Chemical synthesis and biological activity of a novel antibacterial peptide deduced from a pig myeloid cDNA.”

FEBS Lett **337**:303-07

Suh E, Traber PG (1996). “An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation.”

Mol Cell Biol. **16**(2):619-25

Taguchi H., Takahashi M., et. al. (2002). “Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O.”

J Med Microbiol **51**:336-43

Travis S. M., Anderson N N., et. al. (2000). “Bactericidal activity of mammalian cathelicidin- derived peptides.”

Infect Immun **68**:2748-55

Tremethick D. J., Hyman L., et. al. (1996). “High mobility group protein 14 and 17 can prevent the close packing of nucleosomes by increasing the strength of protein contacts in the linker DNA.”

J Biol Chem **271**:12009-16

Trieschmann L., Alfonso P. J., et. al. (1995). “Incorporation of chromosomal proteins HMG-14/ HMG-17 into nascent nucleosomes induces an extended chromatin conformation and enhances the utilization of active transcription complexes.”

EMBO J **14**:1478-89

Tse C., Sera T., et. al. (1998). “Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA Polymerase III.”

Moll and Cell Biol **18**:4629-38

Van Immerseel F., De Buck J., et. al. (2003). “Invasion of Salmonella enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids.”

Int J of Food Microbiology **85**:237-48

Velazquez O. C., Lederer H. M., et. al. (1996). “Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia.”

Dig. Dis. Sci. **41**:727-739

Vestner B., Bustin M., et. al. (1998). “Stimulation of replication efficiency of a chromatin template by chromosomal protein HMG-17.”

J Biol Chem **273**:9409-14

Wachtershauser A., Stein J. (2000). “Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases.”

Eur. J. Nutr. **39**:164-171

Wachtershauser A., Steinhilber D., et. al. (2000). “Expression of 5-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during butyrate-induced cell differentiation.”

Biochem. Biophys. Res. Commun. **268**(24-2):778-783

Whitehead R.H., Young G. P., et. al. (1986). “Effects of short-chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215).”

Gut **27**:1457-63

Wilkinson M. G., Millar J. B., et. al. (2000). “Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signalling pathways.”

FASEB J **14**:2147-57

Winder D., Gunzburg W. H., et. al. (1998). “Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells.”

Biochem. Biophys. Res. Commun. **242**:608-12

Wittig B. M., Zeitz M. (2003). “The gut as an organ of immunology.”

Int. J. Colorectal Dis. **18**:181-187

Witt O., Schulze S, et al.(2001). “Tumor cell differentiation by butyrate and environmental stress.”

Cancer Lett. **171**(2):173-82

Wu J. T., Archer S. Y., et. al. (2001). “Transient vs. Prolonged histone hyperacetylation: effects on colon cancer cell growth, differentiation, and apoptosis.”

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**:G482-90

Yang J., Kawai Y., et. al. (2001). “Sodium butyrate induces transcription from the G alpha (i2) gene promoter through multiple Sp1 sites in the promoter and by activating the MEK-ERK signal transduction pathway.”

J. Biol. Chem. **276**:25742-52

Yamashita Y.-i., Shimada M., et. al. (2003). “Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells.”

Int. J. Cancer **103**:572-576

Yoshida M., Beppu T., (1988). “Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A.”

Exp Cell Res. **177**:122-31

Yoshida M., Kijima M., et. al. (1990). “Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A.”

J Biol Chem **265**:17174-79

Yoshida M., Nomura S., et. al. (1987). “Effects of trichostations on differentiation of murine erythroleukemia cells.”

Cancer Res. **47**:3688-3691

Yoshio H., Tollin M., et. al. (2003). “Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense.”

Pediatr Res **53**:211-216

Zaiou, M., Gallo, R.L., (2002). “Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics.”

J. Mol. Med. **80**:549-561

Zanetti M., Del Sal G., et. al. (1993). “The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac5 predicts a prosequence homologous to a cysteine proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics.”

J Biol Chem **268**:522-26

Zanetti M., Gennaro R., et. al. (1997). “The cathelicidin family of antimicrobial peptide precursors: a component of the oxygen-independent defense mechanism of neutrophils.”

Ann N Y Acad Sci **832**:147-62

Zanetti M., Gennaro R., et. al. (2000). “Structure and biology of cathelicidins.”

Adv Exp Med Biol **479**:203-18

Zasloff M., (2002). “Antimicrobial peptides of multicellular organisms.”

Nature **415**:389-95

Zasloff M., (2002). “Antimicrobial peptides in health and disease.”

N Engl J Med **347**:1199-200

7. Danksagung

Mein tiefster Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Dissertation in verschiedenster Weise beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach für die Möglichkeit bedanken, meine Promotionsarbeit mit seinem Team und in seinem Labor durchführen zu können.

Bei Herrn Priv.- Doz. Dr. med. B. Illert bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei meinem Betreuer Dr. med. J. Schauber möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass er immer ein offenes Ohr hatte und mir im praktischen wie auch im theoretischen Teil mit Anregungen zur Seite stand.

Dem Team des gastroenterologischen Labors gilt mein besonderer Dank für die technische und moralische Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Nicht zu vergessen, bedanke ich mich bei all den kritischen Korrekturlesern, insbesondere auch bei Herrn Peter Röber für die hilfreiche Unterstützung.

8. *Curriculum vitae*

Susanne Heidi Frisch

Geburtsdatum / Ort: 19.04.1978, Würzburg
Eltern: Franz Frisch
Selbständiger Malermeister
Brigitte Frisch, geb. Thum
Bürogehilfin
Geschwister: Stefan Frisch
Selbständiger Malermeister
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1984 - 1988 Grundschole Würzburg, Dürrbachtal
1988 - 1997 Deutschhaus-Gymnasium, Würzburg
(neusprachlicher Zweig)

Studium

Seit SS 1998 Medizinstudium an der Julius- Maximilians- Universität
Würzburg
SS 2000 Ärztliche Vorprüfung
SS 2001 Erstes medizinisches Staatsexamen
Seit SS 2002 Medizinische, experimentelle Doktorarbeit im
Gastroenterologischen Labor der Abteilung für
Innere Medizin an der Universität Würzburg
(Posterbeitrag auf dem Kongress für Innere Medizin,
April 2003;
Mitautorin der Publikation im „Molecular Immunology“,
Juli 2004)
WS 2003 Zweites medizinisches Staatsexamen
Juni 2005 Drittes medizinisches Staatsexamen

Praktika

Sept. 1997 - März 1998 Pflegepraktikum in der Rotkreuzklinik, Würzburg

Famulaturen:

Abdominalchirurgie,
Universitätsklinikum, Lübeck

Paediatric,
Eben- Dönges- Hospital,
Worcester/ Cape Town/ South Africa

Innere Medizin und Paediatric,
Faculty of Medicine, University of Colombo/ Sri Lanka

Paediatric/ Endokrinologie- Praxisfamulatur,
Facharztpraxis für Kinderheilkunde, Berlin

Praktisches Jahr:

Innere Medizin,
Victoria Hospital, University of Cape Town/ South Africa

Chirurgie,
Chirurgische Universitätsklinik, Würzburg

Wahlfach: Neurologie,
Neurologische Universitätsklinik, Würzburg

Berufliche Tätigkeit

Seit Februar 2006 Assistenzärztin in der Neurologie des Krankenhaus der Stiftung
Juliusspital, Würzburg

Sonstige Qualifikationen und Tätigkeiten

1998/1999 Nebentätigkeit im Gastronomiebereich
1999 Ausbildung zur Aerobic-Instructorin;
Seither Tätigkeit als Fitnesstrainerin zur Mitfinanzierung
des Studiums

Sprachkenntnisse: *Englisch* in Wort und Schrift
 Italienisch gute Grundkenntnisse
 Französisch Grundkenntnisse

EDV: Windows 98, Microsoft Office, Power Point,
Schreibmaschinenausbildung

Hobbys

Reisen, Literaturgeschichte, Architektur und Malerei
Dreizehnjährige Ausbildung im klassischen Ballett
Aerobic-Trainerin
Musikalische Ausbildung

Würzburg, den 25. April 2007

