

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

Modulation der Genexpression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in Abhängigkeit von exogenen Faktoren

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Christina Elisabeth Strack

aus Lichtenfels

Würzburg, März 2009

Referent: Prof. Dr. med. W. Scheppach

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Scheurlen

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.09.2009

Die Promovendin ist Ärztin

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das antimikrobielle Peptid LL-37	1
1.2	Das Steroidhormon Vitamin D ₃	8
1.3	Die kurzkettige Fettsäure Butyrat	12
1.4	Das Ernährungssupplement Intestamin®	15
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Chemikalien-Zusammensetzungen (Kits)	20
2.1.4	Chemikalien	21
2.1.5	Primer und Sonden	22
2.1.6	Zelllinien	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zellkultur	23
2.2.2	Stimulationsversuche	24
2.2.3	Analyse der Zellsignalwege	25
2.2.4	Überlebensassay	26
2.2.5	RNA-Extraktion	27
2.2.6	RNA Aufreinigung und RNase-free DNase Behandlung	28
2.2.7	RNA-Konzentrationsmessung und cDNA-Synthese	29
2.2.8	Real-time RT-PCR	29
2.2.9	Statistische Auswertung	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Einfluss von Vitamin D₃ auf die <i>camp</i>-Expression in Kolonepithelzellen	35
3.1.1	Induktion der <i>camp</i> -Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit Vitamin D ₃	35
3.1.2	Induktion der <i>camp</i> -Expression in SW 480 Zellen nach Inkubation mit Vitamin D ₃	37
3.1.3	Induktion der <i>camp</i> -Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit Vitamin D ₃	38
3.1.4	Induktion der <i>camp</i> -Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit Vitamin D ₃	39

3.1.5	Induktion der <i>camp</i> -Expression in der Monozytenzelllinie U 937 nach Inkubation mit Vitamin D ₃	40
3.1.6	Zusammenstellung: <i>camp</i> -Expression in Kolonzellen nach Inkubation mit Vitamin D ₃	41
3.2	Einfluss von Butyrat auf die <i>camp</i>-Expression in Kolonepithelzellen	42
3.3	Einfluss der Co-Stimulation mit Vitamin D₃ plus Butyrat auf die <i>camp</i>-Expression in Kolonepithelzellen	43
3.3.1	Auswirkungen der Co-Stimulation auf die Adenomzelllinie GEKI 02	43
3.3.2	Auswirkungen der Co-Stimulation auf die Karzinomzelllinien HT 29, SW 480 und T 84	45
3.4	Einfluss von Intestamin[®] auf die <i>camp</i>-Expression in Kolonepithelzellen	49
3.4.1	Induktion der <i>camp</i> -Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit Intestamin [®]	49
3.4.2	Induktion der <i>camp</i> -Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit Intestamin [®]	50
3.4.3	Induktion der <i>camp</i> -Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit Intestamin [®]	51
3.4.4	Induktion der <i>camp</i> -Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit Intestamin [®]	52
3.5	Einfluss einer Co-Stimulation mit Intestamin[®] plus Butyrat auf die <i>camp</i>-Expression in Kolonepithelzellen	53
3.6	Rolle des MEK/ERK Signalweges	54
3.6.1	Einfluss des MEK/ERK Signalweges bei der Induktion des <i>camp</i> -Gens durch Vitamin D ₃	54
3.6.2	Einfluss des MEK/ERK Signalweges bei der Induktion des <i>camp</i> -Gens durch Intestamin [®]	56
3.7	Antimikrobielle Aktivität von HT 29 Zellen gegenüber <i>E.coli</i>	62
4	DISKUSSION	64
4.1	Einfluss von Vitamin D₃ auf die <i>camp</i>-Expression in Kolonepithelzellen	66
4.2	Einfluss von Butyrat auf die <i>camp</i>-Expression	71
4.3	Einfluss der Co-Stimulation mit Vitamin D₃ plus Butyrat auf die <i>camp</i>-Expression	72
4.4	Einfluss von Intestamin[®] auf die <i>camp</i>-Expression	77
4.5	Rolle des MEK/ERK Signalweges	81
4.6	Antimikrobielle Aktivität von HT 29 Zellen gegenüber <i>E.coli</i>	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	90

Inhaltsverzeichnis

6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	92
7	LITERATURVERZEICHNIS	95
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
9	TABELLENVERZEICHNIS	120
	DANKSAGUNG	121

1 Einleitung

1.1 Das antimikrobielle Peptid LL-37

Das Überleben des menschlichen Organismus in einer nicht-sterilen Umwelt erfordert ein einzigartiges Netzwerk an Abwehrmechanismen gegenüber krankheitserregenden Mikroorganismen. Da der initiale Kontakt hauptsächlich an Körperoberflächen, wie Haut, Lunge, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt, erfolgt, müssen besonders diese Gewebe über spezielle Mechanismen zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen verfügen. Mit ca. 400m² stellt der Gastrointestinaltrakt die größte Oberfläche beim Menschen dar. Obwohl der Darm in ständigem Kontakt mit Bakterien steht, sowohl der residenten Mikroflora als auch mit pathogenen Keimen, die durch die Nahrung aufgenommen wurden, gelangen diese nicht in die Blutbahn des Menschen. Für die Abwehr der Keime spielt die Barrierefunktion der Darmmukosa eine wichtige Rolle. Neben der Mukosabarriere aus einzelliger Epithelschicht und Muzinschicht, ist das Immunsystem von großer Bedeutung. Erste, unspezifische Abwehrmechanismen zum Beispiel durch Fresszellen oder natürliche Killerzellen, werden durch das angeborene Immunsystem vermittelt, welches wiederum B- und T-Lymphozyten als Effektorzellen des erworbenen Immunsystems aktiviert¹. Eine weitere Abwehrstrategie des angeborenen Immunsystems stellt die Produktion endogener Antibiotika, sogenannter Antimikrobieller Peptide (AMP) dar^{2, 3}. Diese Gruppe umfasst sehr heterogene Effektormoleküle, die als mikrobizide Substanzen und in ihrer Funktionsweise als Entzündungsmediatoren der Bekämpfung pathogener Keime dienen und das adaptive Immunsystem aktivieren⁴. AMPs werden anhand von strukturellen Merkmalen kategorisiert. Beim Menschen spielen neben anderen AMPs Cathelicidine und Defensine eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Defensine teilt man aufgrund ihrer Sekundärstruktur in α - und β -Defensine ein⁵. Bisher sind 6 α - und 4 β -Defensine bekannt^{6, 7}. Vergleichende Genomanalysen zeigen jedoch, dass im menschlichen Genom auf dem achten Chromosom Gene für 11 α -Defensine zu finden sind. Von diesen 11 Genen werden lediglich 6 exprimiert, während es sich bei den übrigen 5 wahrscheinlich um Pseudogene handelt⁸. α -Defensine wurden in Granula Neutrophiler Granulozyten, in Paneth Zellen des Dünndarms und in Epithelzellen des weiblichen Urogenitaltrakts

nachgewiesen^{9,10}, während β -Defensine aus Epithelzellen von Lunge, Darm, Niere und Hoden isoliert werden konnten¹⁰.

Im Gegensatz zu den Defensinen ist für die Cathelicidine nur ein kodierendes Gen auf Chromosom 3 bekannt¹¹, das *camp*-Gen (cathelicidin antimicrobial peptide). Dieses Gen kodiert für das 18kDa große Prä-Pro-Peptid hCAP (human cationic antimicrobial peptide), welches aus einer hoch konservierten N-terminalen Domäne, dem Cathelin besteht, das von einem Signalpeptide und dem variablem C-terminalen Anteil, dem LL-37, flankiert ist¹².

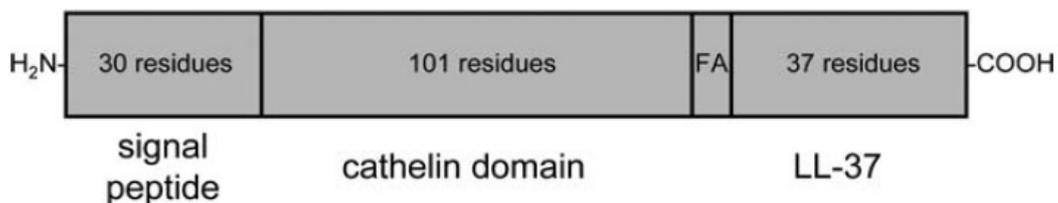


Abb. 1: schematische Darstellung des hCAP 18. Nach Dürr et al.¹²

Die bisherigen Erkenntnisse über die hochkonservierte Cathelin Domäne sind gering. Zaiou konnte zeigen, dass humanes Cathelin antimikrobiell gegenüber *E.coli* und Methicillin-resistenten Staphylokokken wirkt und die Proteaseaktivität von Cathepsin L hemmt¹³. Im Schwein jedoch zeigte sich das Gegenteil. Protegrin-3, die Cathelin Domäne im Schwein, bewirkte eine Aktivierung der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin L¹⁴, die unter anderem an der Antigenpräsentation nach Infektionen beteiligt ist¹⁵. Diese Gegensätzlichkeit im Wirkmechanismus führt Zhu auf strukturelle Unterschiede zwischen dem Cathelin von Mensch und Schwein zurück¹⁴.

Durch die Abspaltung des Signalpeptides entsteht das Cathelicidin, das als Pro-protein die Speicherform des antimikrobiellen Peptides darstellt. Um die biologisch aktive Form des antimikrobiellen Peptides, das LL-37 zu erreichen, bedarf es einer weiteren Spaltung des Vorläuferproteins hCAP 18 durch die Serin Protease 3 zwischen Ala 103 und Leu 104^{16, 17}. LL-37, die reife Form des Cathelicidin, ist ein α -helikales Peptid¹⁸ aus 37 Aminosäureresten und zeigt ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität gegenüber Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen¹⁹⁻²². In *in-vitro* Studien mit synthetisch hergestelltem LL-37 zeigten sich

Stämme von *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterobacter*, *Lactobacillus casei* (Dr. D. Rogoll, persönliche Mitteilung), A-Streptokokken, *Helicobacter pylorum*, Shigellen, Salmonellen und *Candida albicans* empfindlich gegenüber Cathelicidinen²³⁻²⁵.

Die antimikrobielle Aktivität des LL-37 wird hauptsächlich über die Ladung des Peptides vermittelt. In einem Milieu mit neutralem pH-Wert besitzt LL-37 eine positive Ladung von +6²⁶ und amphipathischen Charakter. Das bedeutet, LL-37 weist in seiner dreidimensionalen Struktur aufgrund nicht-polarer Seitenketten eine hydrophobe Seite, andererseits aufgrund polarer, positiv geladener Moleküle auch einen hydrophilen Anteil auf²⁶. Diese Eigenschaften ermöglichen dem Peptid die Bindung an die negativ geladenen Oberflächen von Bakterien und die Einlagerung in Membranen. Die Interaktion von LL-37 mit Biomembranen hängt aber nicht nur von der Ladung ab, sie wird auch beeinflusst durch die Lipidzusammensetzung, die Dichte von Membranen und die Fähigkeit intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen²⁷⁻³⁰. Letztendlich ist die Ursache für die mikrobizide Wirkung die Membranzerstörung. Diese wird entweder durch Porenbildung²⁶ erreicht, oder dadurch dass sich das Cathelicidin parallel zur Membranoberfläche anordnet, einen Teppich bildet und eine positive Kurvenspannung induziert^{12, 30-33}. Aufgrund der mikrobiziden Wirkung sind Resistenzen gegenüber Cathelicidinen selten. Einige Mechanismen sind allerdings beschrieben^{34, 35}. Dazu zählen beispielsweise die Modifikation von Zellwand und Zellmembran durch *Haemophilus influenzae*³⁶, *Staphylococcus aureus*^{37, 38} und *Salmonella enterica*³⁹, die Modifikation des LPS durch *Pseudomonas aeruginosa*⁴⁰ und die Entwicklung von Effluxpumpen durch Gonokokken⁴¹. Einen neuen Resistenzmechanismus gegenüber antimikrobiellen Peptiden entwickelten Shigellen. Der genaue Mechanismus ist noch unklar, jedoch zeigt sich eine Beteiligung von Shigellen Plasmid DNA⁴².

Entdeckt wurde LL-37 in den Neutrophilen Granulozyten des Rinds^{43, 44}. Beim Menschen konnte es erstmals aus Knochenmarkzellen isoliert werden⁴⁵. Es wird von verschiedenen Immunzellen, wie Natürlichen Killerzellen, T- und B-Lymphozyten, Monozyten⁴⁶, Mastzellen⁴⁷ und unreifen Neutrophilen Granulozyten⁴⁸ produziert. hCAP18 wird außerdem von den Epithelzellen der Haut⁴⁹, der Atemwege⁵⁰, der

Konjunktiven⁵¹ des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts⁵² exprimiert. Im Gastrointestinaltrakt wird LL-37 konstitutiv von den Epithelzellen des Magens²⁴, den oberflächlichen, differenzierten Kolonepithelzellen und den Brunnerdrüsen des Duodenums synthetisiert, nicht aber von den Epithelzellen des Dünndarms oder den tiefen Kolonkrypten⁵³. Außerdem findet sich LL-37 im Schweiß⁵⁴, im Sekret von Molldrüsen⁵⁵, Speicheldrüsen⁵⁶, den Brustdrüsen^{57, 58}, Hoden und Nebenhoden^{45, 59} und im Wundsekret⁶⁰. Cathelicidin wird demnach sowohl von phagozytären Zellen, als auch von den Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute synthetisiert und ist damit eine Strategie des angeborenen Immunsystems in der initialen Abwehr pathogener Keime.

Welche Bedeutung Cathelicidine für die Immunabwehr spielen, zeigen Studien an Mäusen. Das Mausmodell eignet sich gut für Untersuchungen und Experimente, die sich mit der Expression des Cathelicidin befassen, da Mäuse, wie Menschen, ein einziges Cathelicidin, das **cathelin related antimicrobial peptide (CRAMP)** genannt wird, besitzen⁶¹. Mäuse, die kein CRAMP besitzen, sind anfälliger gegenüber Infektionen der Haut mit A-Streptokokken⁶². Diese Anfälligkeit führt Nizet darauf zurück, dass die Neutrophilen Granulozyten unfähig sind, Bakterien abzutöten. Auch im Kampf gegen intrazelluläre *Salmonella typhimurium* spielt CRAMP eine Rolle, da von Makrophagen gebildetes CRAMP die Zellteilung der Bakterien hemmt⁶³. CRAMP-defiziente Mäuse, die oral mit *Citrobacter rodentium* infiziert wurden, zeigen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine stärkere Besiedelung des Kolon, eine vermehrte Zellschädigung und gesteigerte systemische Dissemination²³.

Auch beim Menschen spielen Cathelicidine bei vielen Krankheitsbildern eine Rolle. Die meisten sind mit einer erhöhten Expression des LL-37 verbunden, was als Stimulation des Immunsystems interpretiert werden kann.

In der Pathogenese entzündlicher Dermatosen ist Cathelicidin ein Faktor⁶⁴. In Läsionen von Patienten, die an Rosazea oder Psoriasis leiden, zeigt sich ein erhöhtes Niveau an LL-37^{65, 66}, das an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beteiligt ist. Eine gesteigerte Expression von LL-37 zeigen auch Keratinozyten, die mit kutanen Papillomaviren befallen sind⁶⁷. Patienten mit atopischem Ekzem sind aufgrund der

verminderten Expression von LL-37⁶⁸ anfällig für bakterielle Infektionen der Haut. Ein Mangel an LL-37 im Speichel und im Plasma ist verantwortlich für schwere Gingivitiden und Peridontitiden, die Patienten entwickeln, die an der schweren angeborenen Neutropenie, Morbus Kostmann, leiden⁶⁹.

Die räumliche Konformation des Cathelicidins, die für die antimikrobielle Aktivität des Peptides wichtig ist, hängt vom Salzgehalt des umgebenden Milieus ab⁷⁰. Bei Patienten mit Cystischer Fibrose kommt es aufgrund der hohen Ionenkonzentrationen zur Inaktivierung von AMPs. Ein Xenograftmodell der Cystischen Fibrose zeigte, dass eine vierfache Überexpression des LL-37 die Infektionsrate senken und die Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* auf ein normales Niveau reduzieren konnte⁷¹.

Eine Infektion der Lunge mit *Mycobacterium tuberculosis* bewirkt eine erhöhte Expression und Produktion von LL-37 in Lungenepithelzellen und Alveolarmakrophagen. Da aber in tuberkulösen Granulomen keine erhöhte LL-37 Expression gefunden werden konnte, spielt das Cathelicidin wahrscheinlich nur während der frühen Phase einer Infektion eine Rolle⁷².

Nicht nur an der Haut und in der Lunge bedarf es einer ständigen Auseinandersetzung mit potentiell pathogenen Keimen, auch im Urogenital- und Gastrointestinaltrakt übernehmen Cathelicidine eine wichtige Schutzfunktion gegen Eindringlinge.

Chromek zeigte, dass Cathelicidin von den Epithelzellen der ableitenden Harnwege exprimiert wird. Nach Kontakt mit *E.coli* wird innerhalb von Minuten LL-37 sezerniert, so dass eine Invasion von Bakterien vermieden und die ableitenden Harnwege steril gehalten werden können^{73, 74}. Auch an der gastrointestinalen Immunabwehr sind Cathelicidine beteiligt. Infektionen mit *Helicobacter pylori* und Shigellen kommen weltweit vor. Gegen *Helicobacter pylori* wirken Cathelicidine bakterizid und sind an der Abwehr des Bakteriums involviert²⁴. Für die Pathogenese der Shigellen Dysenterie spielt die Reduktion des LL-37 eine Rolle. Shigellen können, um ihr eigenes Überleben zu sichern, die Expression des LL-37 herabsetzen. Islam zeigte, dass Shigellen über die Freisetzung von Plasmid DNA befähigt sind, die Expression des Cathelicidins zu hemmen und dadurch in Epithelzellen einzudringen⁴².

Nicht nur bei infektiösen Erkrankungen des Magendarmtrakts, auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigt sich ein heterogenes Bild der LL-37 Expression. In Biopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa zeigte sich eine erhöhte Expression des LL-37. In Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn dagegen konnte diese weder in entzündeten noch in nicht-entzündeten Darmabschnitten nachgewiesen werden⁷⁵⁻⁷⁸.

Die Überexpression von LL-37 bewahrte Mäuse, die LPS oder *E.coli* injiziert bekamen, vor dem septischen Schock. Die protektive Wirkung des Cathelicidins wurde nicht nur auf seine mikrobiziden Eigenschaften zurückgeführt, sondern es zeigte sich auch, dass LL-37 LPS binden und neutralisieren kann⁷⁹⁻⁸².

Die Entdeckung, dass Cathelicidine neben ihrer antimikrobiellen Aktivität weitere Funktionen in der Immunabwehr erfüllen, führte zu einem weit komplexeren Bild über AMPs als anfangs vermutet.

Cathelicidine wirken *in-vitro* chemotaktisch auf Monozyten, Neutrophile, Mastzellen und CD4 positive T-Zellen^{83, 84}. Die chemotaktische Wirkung auf Neutrophile, Monozyten und T-Zellen wird durch den FPRL1-Rezeptor (Formyl peptide receptor-like 1) vermittelt. Die Wirkung auf Mastzellen wird bei Ratten über eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade vermittelt, die zu einer Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges führt⁸⁵. Der membranständige Rezeptor ist jedoch bisher nicht identifiziert⁸⁴. Interessanterweise stellen Mastzellen nicht nur das Ziel von LL-37 dar, sondern auch eine Ressource. LL-37 induziert die Ausschüttung von Histamin⁸⁴ und trägt als zelluläre Komponente der Mastzellen zur Abtötung der Mikroben in den Phagosomen bei⁴⁷. Auch bei der Phagozytose-unabhängigen antimikrobiellen Aktivität von Mastzellen ist LL-37 beteiligt⁸⁶.

Neben seiner direkten antimikrobiellen und chemotaktischen Funktion stellt Cathelicidin ein integrierendes Element in der Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar⁴, indem es die Differenzierung dendritischer Zellen moduliert⁸⁷. Nach Stimulation mit LL-37 zeigen dendritische Zellen eine erhöhte phagozytotische Kapazität, ein verändertes Expressionsmuster an Oberflächenmolekülen und eine verstärkte Sekretion von Zytokinen, die die Th-1 Antwort induzieren⁸⁷.

Die Mechanismen, die der Regulation des LL-37 zugrunde liegen, sind noch unklar. Über welche Rezeptoren das Cathelicidin seine Wirkung ausübt und über welche Signalkaskaden es selbst aktiviert wird, ist bisher wenig bekannt.

Die chemotaktische Wirkung des Cathelicidins wird über den FPRL1-Rezeptor vermittelt. Dieser findet sich nicht nur auf Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen, sondern auch auf Endothelzellen. Über den von Endothelzellen exprimierten FPRL1-Rezeptor wirkt LL-37 vasodilatatorisch⁸⁸, fördert die Angiogenese und die Neovaskularisation^{89, 90} und ist an der Re-epithelialisierung von Wunden beteiligt⁹¹. Über den FPRL1-Rezeptor ist das Cathelicidin zudem fähig, die Proliferation von Epithelzellen zu stimulieren⁹². In Mammakarzinomen findet sich neben einer vermehrten Expression dieses Rezeptors auch eine vermehrte Expression des LL-37⁹², was sich ebenso in Lungen- und Ovarialkarzinomen beobachten lässt^{93,94}.

Weitere Rezeptoren, die LL-37 aktiviert, sind neben dem FPRL1-Rezeptor, der EGFR⁹⁵ und P2X₇-Rezeptor⁹⁶. Das Cathelicidin stimuliert die Sekretion von Interleukin (IL) 8 in respiratorischen Epithelzellen unter Beteiligung des EGFR und des MEK/ERK Signalweges⁹⁵. Über den purinergen Rezeptor P2X₇ induziert LL-37 die Sekretion und Reifung von IL-1 β in Monozyten⁹⁶. Ebenso beeinflusst LL-37 Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) in immunkompetenten Zellen und führt zu einem veränderten Muster der Zytokin Antwort⁹⁷.

Ein wichtiger molekularer Mechanismus, über den Cathelicidine einerseits die Immunantwort in Monozyten⁹⁸, Neutrophilen⁹⁹ und Keratinozyten¹⁰⁰ modulieren, andererseits aber selbst aktiviert werden, ist die Signaltransduktion über Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen, nämlich ERK1/2 (**extracellular signal-regulated kinase 1/2**) und p38. (**mitogen activated protein, MAP, bzw. mitogen/extracellular regulated protein kinase, MEK/ERK**). Mitogen aktivierte Proteinkinasen sind eine Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen, die als Antwort auf extrazelluläre Stimuli durch Phosphorylierung an zwei Stellen, einem Threonin- und einem Tyrosin-Rest, aktiviert werden. Aktivierte MAP-Kinasen phosphorylieren im Zellkern Transkriptionsfaktoren und regulieren dadurch die Transkription¹⁰¹. Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 aktivieren hauptsächlich Gene, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung

regeln. Die Kinase p38 reguliert Gene, die für Apoptose und Entzündung verantwortlich sind¹⁰².

Über den MAP-Kinase Signalweg wird die Expression von LL-37 in Kolonepithelzellen induziert¹⁰³. Ein auslösender Stimulus ist die kurzkettige Fettsäure Butyrat¹⁰³⁻¹⁰⁵. Abgesehen von Butyrat konnten bisher erst wenige Stimuli gefunden werden, die die Expression von LL-37 induzieren. Weder die typischen Entzündungsmediatoren TNF- α , IFN- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-12 und IL-13, noch Membranbestandteil von Mikroben steigern die Expression von Cathelicidinen in den Epithelzellen von Haut und Kolon^{24, 104}. Erst seit neuestem ist bekannt, dass eine Behandlung mit dem Arachidonsäurederivat Leukotrien B₄ sowohl in Lungenepithelzellen von Mäusen, als auch in menschlichen Neutrophilen Granulozyten zu einer vermehrten Expression von LL-37 führt und zudem eine antivirale Aktivität gegen Influenzaviren vermittelt¹⁰⁶.

Die Steigerung der *camp*-Expression durch Butyrat wird über den Signalweg MEK/ERK vermittelt. Welche Rezeptoren bei der Signalübertragung eine Rolle spielen, ist derzeit Gegenstand der Forschung. Neue Ergebnisse weisen auf die Bedeutung des Vitamin D-Rezeptors hin¹⁰⁷.

1.2 Das Steroidhormon Vitamin D₃

Vitamin D wurde zunächst in Zusammenhang mit der Regulierung des Knochenstoffwechsels und der Beeinflussung von Calcium- und Phosphatspiegeln im Körper gebracht. Die Annahme, Rachitis sei durch einen Mangel an Nährstoffen ausgelöst, führte Sir Edward Mellanby 1919 zur Entdeckung einer fettlöslichen Substanz in der Fischleber¹⁰⁸, dem Vitamin D.

In den letzten beiden Jahrzehnten erkannte man jedoch, dass Vitamin D eine weitaus größere Rolle im Körper spielt und neben dem Knochenstoffwechsel und der Calciumhomöostase auch die Zelldifferenzierung, das Zellwachstums, das Immunsystem und andere hormonale Systeme beeinflusst¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Vitamin D₃ selbst ist biologisch inaktiv und muss durch mehrere Schritte in die hormonell aktive Form, 1,25(OH)₂D₃ auch Calcitriol genannt, umgewandelt werden.

Obwohl Vitamin D₃ in verschiedenen Nahrungsmitteln, hauptsächlich in fettreichen Fischarten, im Fischlebertran und in Eiern, enthalten ist, stellt die Haut die Hauptquelle bei der Synthese von Vitamin D₃ dar. Bestrahlung der Haut mit UV-Licht (270-300 nm Wellenlänge) katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese von Vitamin D₃, die Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol in Prä-Vitamin D₃, das temperaturabhängig zu Vitamin D₃ isomerisiert¹¹². Da Vitamin D₃ und seine Metaboliten lipophile Moleküle sind, müssen sie in der Blutbahn an Transportproteine gebunden sein, um zu den Zielgeweben zu gelangen. Die wichtigsten Transportproteine sind die Vitamin D-bindenden Proteine (DBP). Albumin und Lipoproteine spielen für den Transport eine untergeordnete Rolle¹¹³. Der erste Schritt, um die biologisch aktive Form, 1,25(OH)₂D₃, zu erhalten, erfolgt in der Leber. Vitamin D₃, auch Cholecalciferol genannt, wird dort durch das Enzym 25-Hydroxylase hydroxyliert. Das dadurch gebildete 25-Hydroxycholecalciferol, 25(OH)D₃, wird in einem zweiten Schritt in den proximalen Tubuluszellen der Niere durch das Enzym 1 α -Hydroxylase in das hormonell aktive Secosteroid 1,25(OH)₂D₃, auch Calcitriol genannt, überführt. Die beiden notwendigen Enzyme 25-Hydroxylase und 1 α -Hydroxylase werden durch die Gene CYP27A1 beziehungsweise CYP27B1 kodiert.

Der Abbau des hormonell aktiven 1,25(OH)₂D₃ geschieht in den Zielgeweben durch das Cytochrom P450 Enzym 25-Hydroxyvitamin D 24-Hydroxylase, das durch das Gen CYP24A1 kodiert wird¹¹⁴.

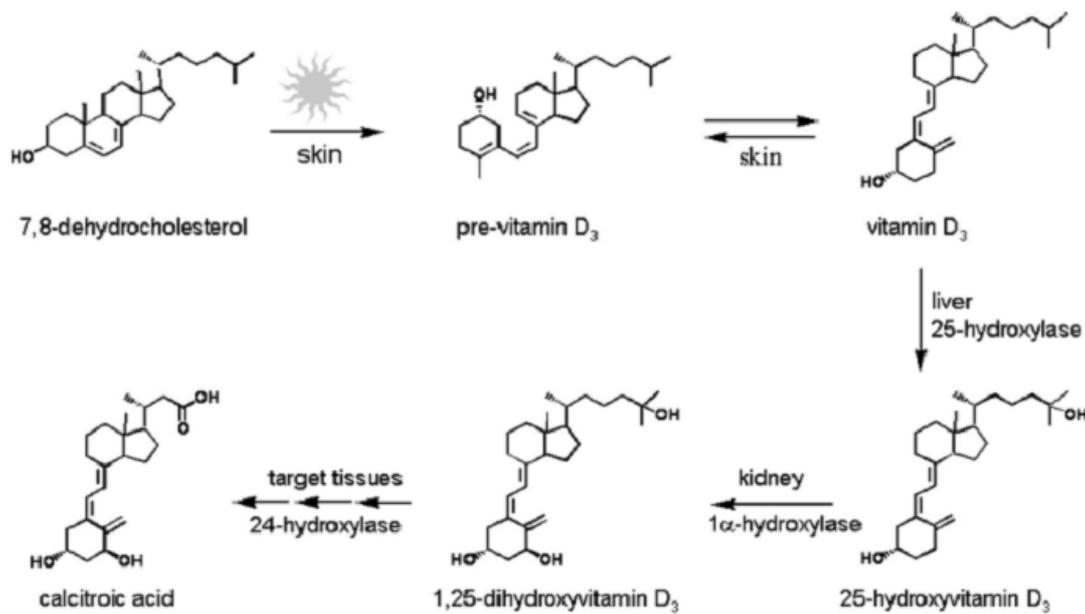


Abb. 2: Vitamin D₃ – Synthese, Metabolisierung und Abbau. Vitamin D₃ wird in der Haut durch photolytische Aktivierung des 7-Dehydrocholesterols produziert. Von dort wird es gebunden an das Vitamin D-bindende Protein (DBP) über die Blutbahn in die Leber transportiert, wo es in 25-Hydroxyvitamin D₃ umgewandelt wird. Als letzter Schritt der Metabolisierung erfolgt - hauptsächlich in der Niere – die Hydroxylierung zu 1,25(OH)₂D₃, der hormonell aktiven Form des Vitamin D₃. In den Zielgeweben wird Calcitriol durch das Enzym 24-Hydroxylase abgebaut. Nach Dusso et al.¹¹⁰

Das Enzym 1 α -Hydroxylase, welches 25-Hydroxycholecalciferol in das hormonell aktive 1,25(OH)₂D₃ überführt, kommt nicht nur in der Niere vor, sondern ist auch extrarenal in verschiedenen Geweben lokalisiert. Es findet sich in Dickdarm, Gehirn, Plazenta, Pankreas, Lymphknoten und der Haut, wo Calcitriol autokrin und parakrin auf die Gewebe wirkt¹¹⁵. Auch Makrophagen und dendritische Zellen exprimieren das Enzym 1 α -Hydroxylase und sind in der Lage, 1,25(OH)₂D₃ zu synthetisieren und zu sezernieren^{116 117}. In Makrophagen wurde Interferon- γ als ein stimulierender Faktor identifiziert¹¹⁷.

Die meisten biologischen Wirkungen, die 1,25(OH)₂D₃ erfüllt, werden durch den Vitamin D₃-Rezeptor vermittelt, einem nukleären Hormonrezeptor¹¹⁴. Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie

der Steroidhormonrezeptoren¹¹⁸. Steroidhormonrezeptoren, wie der VDR, sind aus funktionellen Domänen aufgebaut. Sie besitzen eine DNA-Bindungsdomäne, die zwei Zinkfinger-Motive enthält, die die Bindung des Rezeptors an die DNA ermöglichen. Die spezifische Bindestelle für das Hormon ist die Ligandenbindungsdomäne. Außerdem besitzen Steroidhormonrezeptoren eine N-terminale Domäne, deren Funktion noch unklar ist, eine hinge-Region als Verbindungsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne am C-terminalen Ende^{114, 119}. Bindet die aktive Form des Vitamin D₃ das Calcitriol an den VDR, bewirkt dies eine Konformationänderung des Rezeptors, die zu einer Heterodimerisation mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) (Retinsäurerezeptor) führt. Der entstandene VDR-RXR Komplex kann nun an spezifische Nukleotidsequenzen der DNA binden. Er interagiert mit Vitamin D Response Elementen (VDRE) in den Promotorregionen der entsprechenden Gene, die sowohl als positive als auch als negative Regulatoren der Transkription ausgebildet sein können¹²⁰.

Neben diesem „genomischen“ Wirkprinzip, das die Aktivierung des nukleären VDR mit nachfolgender Transkription und Translation erfordert, sind auch „nicht-genomische“ Effekte des 1,25(OH)₂D₃ bekannt, die innerhalb von Sekunden bis Minuten auftreten. Zu den nicht-genomischen Wirkungen des Vitamin D₃ gehört unter anderem die schnelle Ca²⁺ Resorption aus dem Dünndarm, die durch einen membranständigen VDR vermittelt wird¹²¹⁻¹²³.

Die meisten Wirkungen, die Vitamin D vermittelt, werden über den nukleären Vitamin D-Rezeptor vermittelt. Die Entdeckung, dass der VDR in Antigen präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, konstitutiv exprimiert wird und seine Expression in Lymphozyten induzierbar ist, weist auf eine Beteiligung des Vitamin D₃ bei der Immunabwehr hin¹¹¹.

Die Auswirkungen des 1,25(OH)₂D₃ auf das Immunsystem betreffen insbesondere T-Lymphozyten. VDR Agonisten können über die Modulation der Zytokinproduktion T-Zellen beeinflussen. T-Helfer-Zellen werden in zwei Gruppen eingeteilt, die T_H1-Zellen und T_H2 Zellen. T_H1 Zellen aktivieren durch die Ausschüttung von IL-2, TNF- α und IFN- γ die zelluläre Immunantwort. T_H2 Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-6 und IL-

10 und beeinflussen über die Aktivierung von B-Zellen mit konsekutiver Antikörperproduktion die humorale Immunantwort¹²⁴. Die T_H1 vermittelte Immunabwehr ist wichtig für die Bekämpfung von Tumorzellen und intrazellulären Pathogenen, beispielsweise Viren, die T_H2 Antwort ist involviert an der Abwehr von extrazellulären Pathogenen, wie den meisten Bakterien und Parasiten. Die T-Zellantwort kann durch Vitamin D₃ reguliert werden. Über die Beeinflussung der Zytokine hemmen VDR Agonisten die Entwicklung von T_H1 Zellen und begünstigen die T_H2 vermittelte Immunantwort¹²⁵⁻¹²⁷. Dieser immunmodulatorische Effekt des Calcitriols wurde in einem Versuch mit Mäusen bereits zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen genutzt¹²⁸. Für diese Autoimmunerkrankungen, die mit einem Ungleichgewicht zwischen T_H1 Zellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, und T_H2 Zellen einhergehen, sind Vitamin D₃ und der VDR von Bedeutung¹²⁹.

Die Beeinflussung der T-Zell-vermittelten Immunantwort durch 1,25(OH)₂D₃ und die Möglichkeit von immunkompetenten Zellen, wie T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, Calcitriol zu synthetisieren und abzubauen, lässt auf eine wichtige Rolle des Vitamin D₃ für das Immunsystem schließen.

1.3 Die kurzkettige Fettsäure Butyrat

Neben den vielfältigen Aufgaben, die das Vitamin D₃ System im Organismus erfüllt, ist der Vitamin D-Rezeptor auch an der Steigerung des Cathelicidin Gens *camp* beteiligt¹⁰⁷. Dabei stellt Butyrat einen Stimulus für die Induktion der Genexpression dar¹⁰⁵. Butyrat ist eine kurzkettige Fettsäure (SCFA), die durch bakterielle Fermentation unverdaulicher Kohlenhydrate im Kolon entsteht¹³⁰. Die Funktionen, die Butyrat im menschlichen Kolon erfüllt, sind vielfältig. Neben seiner Rolle als Energiequelle, wirkt Butyrat auf die intestinale Barriere, ist am Abbau von oxidativem Stress beteiligt und hat auf Kolonzellen antientzündliches und antikarzinogenes Potential¹³¹.

In einer 2003 veröffentlichten Studie wurde der präventive Effekt einer ballaststoffreichen Ernährung bestätigt. Je ballaststoffreicher sich die Probanden ernährten, desto geringer war die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms¹³². Diese Erkenntnisse intensivierten die Suche nach den zugrundeliegenden Mechanismen, um zu entschlüsseln, wie Ballaststoffe auf die Schleimhaut des Darms wirken. Ballaststoffe

sind unverdauliche pflanzliche Nahrungsbestandteile, meist Polysaccharide, die durch die Enzyme des Dünndarms nicht gespalten werden können und im Kolon von Anaerobiern fermentiert werden. Butyrat liegt als schwache Säure zu mehr als 90% in anionischer, dissoziierter Form im Lumen vor¹³³. 95-99% der SCFA werden rasch aus dem Lumen absorbiert¹³⁴. Die Aufnahme aus dem Lumen durch die apikale Membran der Kolonepithelzellen erfolgt entweder durch aktiven Transport der dissoziierten Form mittels des SCFA-Transporters^{135, 136}, im Austausch gegen HCO_3^- ^{137, 138}, oder als Diffusion der undissoziierten, lipidlöslichen Form des Butyrats¹³⁰. Die Mehrheit des absorbierten Butyrats wird in den Kolonepithelzellen metabolisiert, nur wenig gelangt mit dem Blut zur Pfortader^{131, 139}.

In gesunden Kolonepithelzellen erhöht Butyrat in den basalen Krypten die Proliferationsrate. Da physiologisch die Zellteilung auf die basalen Kolonkrypten begrenzt ist, wird angenommen, dass Butyrat die physiologischen Proliferationsmuster stimuliert^{134, 140}. Auf Kolonkarzinomzellen hingegen besitzt Butyrat eine konträre Wirkung. In *in-vitro* Versuchen induziert Butyrat die Apoptose, inhibiert die Proliferation und induziert die Zelldifferenzierung¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Die Zelldifferenzierung, die in kolorektalen Karzinomzellen durch Butyrat hervorgerufen wird, ist vergesellschaftet mit der Hochregulierung des Vitamin D-Rezeptors (VDR). Butyrat und Vitamin D₃ besitzen hinsichtlich der Zelldifferenzierung synergetische Effekte, da Butyrat den VDR hochreguliert, Vitamin D₃ daran bindet und über Zellzyklusregulatoren die Zelldifferenzierung beeinflusst^{145, 146}.

Diese gegensätzlichen Effekte, die Butyrat auf normale und neoplastische Kolonepithelzellen ausübt, werden als „Butyrat-Paradox“ bezeichnet^{140, 142}. Csordas erklärt das Butyrat-Paradox durch die unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen von Butyrat innerhalb der Kolonkrypten, die aufgrund der unterschiedlichen Absorption und dem intrazellulären Metabolismus von Butyrat entstehen¹⁴⁷.

Der Einfluss von Butyrat auf die Zellfunktion beruht auf der Regulation der Genexpression. Eine Vielzahl von Veränderungen im Zellkern, wie die Hyperacetylierung von Histonen und Nichthiston-Proteinen, die Inhibition der Histon-Phosphorylierung und die Methylierung der DNA, werden auf Butyrat zurückgeführt¹⁴⁸⁻

¹⁵². Eine Acetylierung von Histonen neutralisiert den positiv geladenen Lysinrest am N-terminalen Ende und verringert dadurch die Affinität der Histone zur negativ geladenen DNA. Durch die Auflockerung der Chromatinstruktur wird den Transkriptionsfaktoren der Zugang zur nukleosomalen DNA erleichtert und die Genexpression aktiviert¹⁵³. Zwei Enzyme sind für die Hyperacetylierung von Histonen von Bedeutung. Sie resultiert aus der Aktivierung der Histonacetyltransferase (HAT) und der Inhibition der Histondeacetylase (HDAC)¹⁵⁴. Butyrat stellt einen Inhibitor der Histondeacetylase (HDAC) dar^{155, 156} und steigert die Genexpression einer Vielzahl von Genen. Stärker als andere kurzkettige Fettsäuren, zum Beispiel Propionat oder Acetat, induziert Butyrat die Expression des Cathelicidins LL-37^{103, 105}.

Diese Erkenntnis nutzte Raqib für seine Studie. Er infizierte Kaninchen mit Shigellen, die, wie Islam für den Menschen bereits zeigte⁴², in der Lage sind, die Expression von Cathelicidinen in den Epithelzellen des Rektums herabzusetzen. Nach einer 24 stündigen oralen Behandlung mit Butyrat verbesserte sich die klinische Symptomatik der Kaninchen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Außerdem reduzierte die Behandlung mit Butyrat die Zahl der infektiösen Bakterien im Stuhl und induzierte die Expression von hCAP in den Epithelzellen¹⁵⁷. Diese Studie zeigt, dass Butyrat bei der Infektion mit Shigellen durch eine vermehrte Synthese von LL-37 einen therapeutischen Effekt hat.

Kurzkettige Fettsäuren, insbesondere Butyrat, sind für die Expression antimikrobieller Peptide bedeutend. Sie sind somit an der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere und der Abwehr von pathogenen Keimen beteiligt, und nehmen eine immunmodulatorische Funktion im Gastrointestinaltrakt ein.

1.4 Das Ernährungssupplement Intestamin®

Für die Abwehr pathogener Keime im Darm bedarf es der Verflechtung mehrerer Verteidigungsstrategien des Immunsystems. Neben der Produktion antimikrobieller Peptide, die zum einen direkt mikrobizid auf Keime wirken, zum anderen in der Lage sind, das adaptive Immunsystem zu aktivieren, bildet die Barrierefunktion der Mukosa die Grundlage für die Abwehr von Mikroben im Darm.

Die Barrierefunktion wird unter anderem durch die einzellige Epithelschicht von Enterozyten bzw. Kolonozyten gebildet. Da diese Zellen den Hauptanteil ihres Energie- und Nährstoffbedarfs aus dem Darminhalt gewinnen^{131, 158}, ist die Zufuhr enteraler Nahrung für ihre Funktion unerlässlich. Nährstoffmangel führt zur Atrophie der Darmmukosa und zum Zusammenbruch der intestinalen Barrierefunktion.

Der Zusammenbruch der Mukosabarriere und die Translokation von Bakterien¹⁵⁹ sind für infektiöse Komplikationen nach großen chirurgischen Eingriffen und bei schwerkranken Patienten verantwortlich. Die herabgesetzte Darmmotilität, die fehlende Integrität der Mukosabarriere mit erhöhter Permeabilität und die eingeschränkte Immunfunktion sind prädisponierende Faktoren, die zur Entstehung einer Sepsis, eines systemischen Inflammations-Response-Syndroms (SIRS) oder eines multiplen Organ-Dysfunktions-Syndroms (MODS) beitragen^{160, 161}. Zusätzlich wird dem Darm dieser schwerkranken Patienten durch die medizinische Behandlung, die oftmals eine antibiotische Therapie und womöglich auch eine maschinelle Beatmung beinhaltet, Schaden zugefügt. Der Nährboden für Infektionen mit *Clostridium difficile* wird durch eine antibiotische Therapie bereitet¹⁶². Die mechanische Beatmung verringert die Perfusion im Splanchnikusgebiet und führt zu einer weiteren ischämischen Schädigung der Enterozyten¹⁶³.

Um diesen Kreislauf zu unterbrechen, ist die frühzeitige enterale Ernährung von schwerkranken Patienten entscheidend. Neben enteralen Nährstofflösungen, die hauptsächlich der Energiezufuhr dienen, gibt es seit mehreren Jahren spezielle Präparate zur enteralen Immuno- bzw. Pharmakonutrition. Unter den Begriffen Pharmakonutrition und Immunonutrition wird die enterale Zufuhr von Schlüsselsubstraten für bestimmte Zell- und Organfunktionen zusammengefasst, die auf die Stabilisierung des Stoffwechsels und die Beeinflussung einzelner Organ- und Zellfunktionen abzielen¹⁶⁴.

Ein Präparat zur Pharmakonutrition stellt Intestamin[®] (Fresenius Kabi) dar. Intestamin[®] wird als Ernährungssupplement für kritisch kranke Intensivpatienten mit eingeschränkter Verdauungsleistung und kritischer Stoffwechsellage angewandt. Diese Patienten sind nach großen gastrointestinalen Operationen, schweren Traumata oder einer akuter Pankreatitis besonders gefährdet, an einer Sepsis, einem systemischen Inflammations-Response-Syndrom (SIRS) oder einem multiplen Organ-Dysfunktions-Syndrom (MODS) zu erkranken.

Da Intestamin[®] ballaststofffrei ist, kann es postoperativ früh eingesetzt werden und die Vulnerabilität des Darms gegenüber pathogenen Keimen, Ischämie und Reperfusionsschäden kann verringert werden. Das Präparat setzt sich aus Glutamin, Tributyrin, Zink, Selen, β -Carotin, Vitamin E und Vitamin C zusammen. Glutamin ist eine nicht-essentielle Aminosäure, die intrazellulär in freier Form vorliegt. Der größte Anteil des im Körper vorkommenden Glutamins findet sich im Skelettmuskel¹⁶⁵. Als Substrat für Lymphozyten und Makrophagen hat Glutamin Einfluss auf das Immunsystem¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ und ist als Energiequelle für die Enterozyten des Dünndarms und die Kolonozyten für den Darm von Bedeutung^{169, 170}. Es konnte gezeigt werden, dass die postoperative Verabreichung von Glutamin die intestinale Barriere aufrechterhält und die Permeabilität reduzieren kann¹⁷¹. Studien, die die bakterielle Translokation von Bakterien untersuchten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. In einer zeigte Glutamin diesbezüglich einen präventiven Effekt¹⁷², in einer anderen nicht¹⁷³.

Desweiteren enthält Intestamin[®] Tributyrin und Antioxidantien. Tributyrin ist ein Triglyzerid aus drei Molekülen Butyrat verestert mit Glycol, das nach Hydrolyse durch pankreatische und gastrische Lipasen zu Butyrat abgebaut wird¹⁷⁴. Es kann, als Vorstufe des Butyrat, oral verabreicht werden¹⁷⁵ und wird von den Patienten gut vertragen¹⁷⁴. Antioxidantien wie Zink, Selen, β -Carotin, Vitamin E und Vitamin C schützen vor oxidativem Stress. Als Abwehrstrategie gegen Mikroben, generiert der Körper Sauerstoffradikale aus Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2). Freie Sauerstoffradikale können aber auch bei der Reperfusion ischämischer Organe oder im Rahmen einer Entzündungsreaktion entstehen. Damit sie nicht körpereigene Strukturen schädigen, indem sie beispielsweise DNA-Schäden verursachen und zum Zelltod führen, benötigt der Organismus antioxidative Substrate, die die Sauerstoffradikale aufnehmen können.

Intestamin[®] wird bei schwer kranken Patienten und in der frühen postoperativen Phase eingesetzt. Verabreicht wird es über eine nasogastrale oder nasojejunale Sonde oder eine Jejunostomie in einer Menge von 500 ml pro Tag. In klinischen Studien konnte die gute Verträglichkeit des Präparats nachgewiesen werden¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das Präparat vom Körper aufgenommen und verstoffwechselt wird¹⁸⁰. Die Serumlevel von Glutamin und Butyrat und die der Antioxidantien Vitamin C, E und β -Carotin stiegen nach Gabe von Intestamin[®] an. Zink und Selen allerdings stiegen im Serum im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe nicht an¹⁸¹. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Intestamin[®] an Patienten mit Sepsis die Organfunktion verbesserte, auf sekundäre Infektionen oder Komplikationen jedoch keinen Einfluss hatte¹⁸¹.

Welche Effekte Intestamin[®] auf den Körper hat und über welche Mechanismen es auf den Organismus wirkt, ist bisher noch unklar. Die Einzelsubstanzen, aus denen Intestamin[®] besteht, wurden *in-vitro* und *in-vivo* oftmals untersucht, nicht jedoch ihre Kombination in Form des Präparats Intestamin[®]. Welche Auswirkungen Intestamin[®] auf zellulärer Ebene hat, und ob es möglicherweise Auswirkung auf das lokale Immunsystem des Darms hat und die Expression antimikrobieller Peptide beeinflussen kann, war bisher noch nicht Gegenstand der Forschung.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Die Epithelzellen des Kolons, die in ständigem Kontakt mit einer Vielzahl von Bakterien stehen, verfügen über spezielle Strategien zur Abwehr pathogener Keime im Darm. Als Barriere dient die einzellige Epithelschicht, die, ausgestattet mit Effektormolekülen wie antimikrobiellen Peptiden, gegen Mikroben Widerstand leistet. Das Wissen über die Faktoren, die die Synthese antimikrobieller Peptide, insbesondere des humanen Cathelicidins LL-37, beeinflussen, ist bisher noch lückenhaft.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Butyrat und Intestamin[®] auf die Expression des *camp*-Gens anhand von *in-vitro* Experimenten mit Kolonepithelzellen analysiert werden. Nach Stimulation der Kolonepithelzellen HT 29, T 84, SW 480, SW 620 und GEKI 02 mit den genannten Substanzen wurde die

Expression des *camp*-Gens bestimmt. Nach der Dosisfindungsstudie wurde zudem untersucht, ob eine Co-Stimulation der Zellen mit 1,25(OH)₂D₃ plus Butyrat, bzw. Intestamin[®] plus Butyrat eine weitere Beeinflussung der Genexpression im Vergleich zur Einzelsubstanz bewirken kann.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Ergründung intrazellulärer Signalwege, die an der Regulation des LL-37 beteiligt sind. Bei der Induktion der *camp*-Expression durch Butyrat spielt der Signalweg MEK/ERK eine Rolle¹⁰³. Ob die Signaltransduktion über den MEK/ERK-Weg für den Einfluss von Vitamin D₃ und Intestamin[®] auf das Cathelicidin LL-37 von Bedeutung ist, war Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Zudem wurde geprüft, ob sich die Stimulation der Kolonepithelzellen HT 29 mit Vitamin D₃ und Butyrat auf ihre antimikrobielle Aktivität gegenüber *E.coli* auswirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Abzug	Köttermann, Uetze-Hänigsen, Dtl.
Brutschrank HeraCell	Hereus, Hanau, Dtl.
Gefrierschrank -80° C -20°C	Forma Scientific, Marjetta, Ohio, USA Liebherr, Ochsenhausen, Dtl.
GeneAmp®PCR-System 9700	Applied Biosystems PE, Darmstadt, Dtl.
iCycler™iQ	BioRad, München, Dtl.
Lyophile (Gefriertrockner)	Christ-Alpha2-4, Christ, Osterode, Dtl.
Neubauer-Zählkammer Bright Line 10 µl	Schott Glas, Mainz, Dtl.
Photometer Ultrospect 2100 Pro	Amersham, Bioscience, Freiburg, Dtl.
Pipetten (10,20,100,200,1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Pipettierhilfe Pipettboy acu	Integra Bioscience, Fernwald, Dtl.
Quarzküvette 100 µl	Hellma, Mühlheim, Dtl.
Sterilwerkbank Gelaire BSB 4	Bioflow Technik, Meckenheim, Dtl.
Vortexer : JK MS2 Minishaker Heidolph REAX 2000	IKA®, Wilmington, North Carolina, USA Heidolph, Schwabach, Dtl.
Zentrifugen: Biofuge Fresco Micro Centrifuge	Heraeus, Hanau, Dtl. Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Optical-Caps (8Caps/Stripe)	Applied Biosystems PE, Darmstadt, Dtl.
96-Well Optical Reaction Plate mit Barcode (Code 128)	Applied Biosystems PE, Darmstadt, Dtl.
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Reaktionsgefäße: 1,7 ml Safe Seal Microcentrifuge Tubes 1,5 ml Safe Seal Microtube 0,2 ml MicroAmp® Reaction Tube 15, 50 ml Tubes	Sörenson Bio Science, West Salt Lake City UT, USA Sarstedt AG, Nürnberg, Dtl. Applied Biosystems, Cheshire, UK Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Dtl.
Stipette 10 ml	Costar®, Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Dtl.

2.1.3 Chemikalien-Zusammensetzungen (Kits)

RNase-free DNase Set (QIAGEN, Hilden, Dtl.):

- RDD Buffer
- RNase-free DNase I
- RNase-free water

RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Dtl.):

- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-free water
- RNeasy mini spin columns
- Collection tubes (1,5 ml)
- Collection tubes (2 ml)

iScript™cDNA Synthesis Kit (BioRad, München, Dtl.):

- iScript Reaction Mix
- Nuclease-free water
- iScript Reverse Transcriptase

2.1.4 Chemikalien

Bactotrypton	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl
Butyrat	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Chloroform	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
DMSO (Dimethylsulfonyloxid)	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl. / Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl
EGF (rh) (Epidermal Growth Factor, recombinant, human)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Holland
Fetales Bovines Serum (FBS)	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Fungizone	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Gentamicin	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Glucose	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Ham's Nutrient Mixture F-12	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Hefe-Extrakt	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
HEPES Buffer	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Intestamin®	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Dtl.
L-Glutamin	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Luria-Bertani (LB) Medium	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
2-Mercaptoethanol	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
Minimal Essential Medium (MEM)	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Mitomycin-C plus Serumextender	BD Bioscience, Bedford, MA, USA
NaCl	Roth, Karlsruhe, Dtl.
Non Essential Amino Acids (NEAA)	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Phosphate buffered Saline (PBS)	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
peqGOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen, Dtl.
RPMI 1640 Medium	Invitrogen™GmbH, Karlsruhe, Dtl.
TGF- α (Transforming Growth Factor α)	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.
U0126	Cell Signaling, Massachusetts, US
1,25(OH) ₂ D ₃	Sigma®-Aldrich, Steinheim, Dtl.

2.1.5 Primer und Sonden

- Universal Mastermix: Absolute™QPCR Mix, Abgene, Surrey, UK
- LL-37 Forward Primer (5'-ACC CAG CAG GGC AAA TCT C-3'): MWG Biotech AG, Ebersberg, Dtl
- LL-37 Reverse Primer (5'-GAA GGA CGG GCT GGT GAA G-3'): MWG Biotech AG, Ebersberg, Dtl.
- LL-37 Probe (5'-TGT TAT CCT TAT CAC AAC TGA T-3): Applied Biosystems, Cheshire, UK
- Human GAPDH G3: Applied Biosystems, Cheshire, UK

2.1.6 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden vier verschiedene Zelllinien von kolorektalen Karzinomen, eine Adenomzelllinie und eine Monozytenzelllinie verwendet. Die Zelllinien HT 29 (ATCC HTB-38), T 84 (ATCC CCL-248), SW 480 (ATCC CCL-228) und SW 620 (ATCC CCL-227) entstammen kolorektalen Karzinomen, GEKI 02 einem Kolonadenom und U 937 (ATCC CRL-1593) einem Lymphoblastom. Die neoplastischen U 937 Zellen stammen aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen weißen Mannes, der an einem diffusen histiozytischen Lymphoblastom litt¹⁸². Die Zelllinie HT 29 isolierte J. Fogh 1964 aus einem mäßig differenziertem (G 2) Kolonadenokarzinom einer 44-jährigen weißen Frau¹⁸³. Die Zelllinie SW 480 wurde 1976 von A. Leibovitz aus einem undifferenzierten Kolonadenokarzinom (G 4, Duke B) eines 50 jährigen weißen Mannes kultiviert. SW 620 Zellen stammen aus einer Lymphknotenmetastase desselben Tumors¹⁸⁴. Die Zelllinie T 84 stammt aus einer Lungenmetastase eines Kolonkarzinoms eines 72 Jahre alten Mannes¹⁸⁵.

Die kolorektalen Karzinomzelllinien und die Monozytenzelllinie U 937 wurden alle von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) bezogen.

Obwohl diese kolorektalen Karzinomzelllinien wissenschaftlich etabliert sind und für die Erforschung des Kolonkarzinoms und der Physiologie intestinaler Zellen eine große Rolle spielen, repräsentieren sie jedoch nicht die gesunden, normalen

Kolonepithelzellen. Da diese Zelllinien seit langem kultiviert werden, besitzen sie dadurch bedingt womöglich noch weitere chromosomale Aberationen oder genetische Alterationen als sie karzinombedingt bereits aufweisen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die kolorektale Adenomzelllinie GEKI 02 verwendet, die im gastroenterologischen Labor von Professor Scheppach etabliert wurde. Die Zelllinie GEKI 02 wurde aus einem tubulovillösen Rektumadenom einer 57-jährigen Frau isoliert. Da es sich um ein sehr frühes Stadium der Adenom-Karzinom-Sequenz handelt, sind die Zellen genetisch stabil und weisen wenige chromosomale Aberrationen auf. Sie sind daher von großem Interesse für *in-vitro* Studien zur Erforschung der Genese von Kolonkarzinomen und ihrer Prävention¹⁸⁶.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

HT 29 Zellen wurden in Minimum Essential Medium (MEM) kultiviert, dem 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 0,4% HEPES Buffer, 1% NEAA, 2 mM L-Glutamin und 2% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt waren. T 84 Zellen wurden in Ham's Nutrient Mixture F-12 und in Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM) in einem Verhältnis von 1:1 angezüchtet unter Zusatz von 10% FBS, 2 mM l-Glutamin und 2% Penicillin/Streptomycin. SW 620 Zellen wuchsen in DMEM, das mit 10% FBS und 5% Penicillin/Streptomycin versetzt war. Die Zellen der Zelllinien SW 480 und U 937 wuchsen in RPMI 1640 Medium, dem 10% FBS und 2% Penicillin/Streptomycin zugegeben waren. Die Kultivierung der GEKI 02 Zellen erfolgte in DMEM unter Zusatz von 1% MEM-Vitamine, 10% FBS, 20% rhEGF (Epidermal Growth Factor, human, recombinant), 10% TGF- α (Transforming Growth Factor α), 0,2% Fungizone, 0,1% Mitomycin-C plus Serumextender, 1,25% Gentamicin und 1% Penicillin/Streptomycin.

Bei allen Versuchen, bei denen die antimikrobielle Aktivität der verschiedenen Zelllinien gegenüber *E.coli* in Überlebensassays getestet wurde, wurden die Zellkulturmedien ohne Zusatz von Antibiotika verwendet.

Alle Zelllinien wuchsen als Monolayer. Je Zelllinie wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und mit 4 ml Medium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.2 Stimulationsversuche

Um die Auswirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Butyrat und Intestamin[®] auf die *camp*-Expression zu analysieren, wurden Stimulationsversuche durchgeführt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde in verschiedenen Konzentrationen (1, 7,5, 10, 15, 25 und 50 nM) dem serumfreien Medium zugefügt und die Zellen über 8, 24 oder 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Für die Koinkubationsversuche wurden 25 nM Vitamin D_3 , 4 mM Butyrat oder 25 nM Vitamin D_3 plus 4 mM Butyrat dem serumfreien Medium zugegeben und die Zellen ebenfalls über 8, 24 oder 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 angezüchtet. Intestamin[®] wurde den Zellen in verschiedenen Konzentrationen (1,25%, 2,5%, 5% und 10%) und in Kombination mit 4 mM Butyrat zugefügt. Die Zellen wurden anschließend über 8, 24 oder 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Als Kontrolle dienten Zellen, die nur im Medium kultiviert wurden. Sie wurden bei jedem Experiment mitgeführt und zeitgleich mit den behandelten Zellen geerntet.

Intestamin[®] wurde freundlicherweise von der Firma Fresenius Kabi zur Verfügung gestellt. In dem Nahrungsergänzungsmittel Intestamin[®] sind durchschnittlich pro 500 ml enthalten:

Energiewert	210 kJ (=250 kcal)
Protein (als Glutamin Dipeptide)	42,5 g
davon Glutamin	30 g
davon Glycin	10 g
Stickstoff	9 g
Kohlenhydrate (als Maltodextrin)	19 g
Fett (als Tributyrin)	1 g
Osmolalität	550 mosmol/kg H ₂ O
Mineralien und Spurenelemente:	
Natrium	460 mg
Kalium	260 mg
Zink	20 mg
Selen	300 µg
Vitamine:	
β-Carotin	10 mg
Vitamin E	500 mg
Vitamin C	1500 mg

Tabelle 1: durchschnittlicher Inhalt pro 500 ml Intestamin[®] (Fresenius Kabi)

2.2.3 Analyse der Zellsignalwege

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss des intrazellulären Signalweges MEK/ERK auf die durch 1,25(OH)₂D₃ und Intestamin[®] induzierte *camp*-Expression zu untersuchen. Hierfür wurde der spezifische MEK 1-Inhibitor U0126 (10 µM) verwendet. Die Zellen der jeweiligen Zelllinien wurden mit oder ohne U0126 für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 25 nM Vitamin D₃ bzw. 10% Intestamin[®] wurden die Zellen für weitere 8, 24 oder 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.4 Überlebensassay

Um die antimikrobielle Aktivität der mit Vitamin D₃ und Butyrat behandelten Zellen gegenüber *E.coli* zu untersuchen, wurde ein Überlebensassay etabliert.

Dafür wurde der apathogene Laborstamm *E.coli* K12, verwendet. Über Nacht wurde eine Kultur von *E.coli* in Luria-Bertani (LB) Medium mit 5 mM Glucose bei 37°C angeimpft. Das Luria-Bertani Medium besteht aus 10g Bactotrypton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl und dH₂O ad 1,0 l. Die Kultur wurde am nächsten Tag im Verhältnis 1:100 in LB Medium verdünnt und bei 37°C inkubiert bis die OD₅₉₀ = 0,5 betrug.

Zur Auswertung der antimikrobiellen Aktivität wurden Agarplatten (LB Medium plus 1,5% Agar) hergestellt, in die vor Versuchsbeginn Löcher gestanzt wurden.

HT-29 Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit Ethanol, 25 nM Vitamin D₃, und 4 mM Butyrat in Antibiotika-freiem Medium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nun wurden die Zellen in 2 ml Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gelöst und zweimal 30 min lang im Ultraschallbad lysiert. Anschließend wurden sie 5 Minuten lang bei 13000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Sammelröhrchen überführt.

Da die Konzentration des von HT 29 Zellen produzierten LL-37 generell gering ist, wurde die Gefriertrocknung zur Aufkonzentrierung genutzt. Mit Hilfe der Lyophilen (Christ-Alpha 2-4) wurde die Zellsuspension bis 0,2 ml ankonzentriert.

Je 100 µl Zellsuspension wurden in die Ausstanzungen der vorbereiteten LB-Agar-Platten gegeben. Die Platten wurden kurz zum Trocknen bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit einem *E.coli* haltigen Weichagar (0,5% Agar)(in der log Phase) übergossen. Dazu wurden 20 ml Weichagar mit 40 µl *E.coli* versetzt, jede LB-Platte vorsichtig beschichtet und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das von den Zellen synthetisierte LL-37 wird in die Gelmatrix der Agarplatten abgegeben und lysiert die darin immobilisierten *E.coli* Bakterien. Um die Ausstanzungen, in die die Zellsuspensionen pipettiert waren, bildet sich dadurch ein Hof von lysierten Bakterien, der transparent erscheint. Am Durchmesser der transparenten Bereiche lässt sich die antimikrobielle Aktivität der Zellen gegenüber *E.coli* ablesen.

2.2.5 RNA-Extraktion

Nachdem die Zellen der verschiedenen Zelllinien durch die Substanzen Vitamin D₃, Butyrat, Intestamin[®] oder U0126 stimuliert worden waren, wurde die RNA der Zellen extrahiert.

Die RNA-Extraktion erfolgte zu jedem Messzeitpunkt (8 h, 24 h, 48 h) mittels peqGOLD Trifast[®]. Trifast[®] enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Die Methode der RNA-Extraktion besteht aus fünf Schritten: Homogenisieren der Probe, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen und Lösen der RNA.

Zum Homogenisieren wurden die adhären Zellen unter Zugabe von 1 ml Trifast pro 25 cm² Zellkulturflasche nach kurzer Einwirkzeit mit einem Zellschaber gelöst und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 1,2 ml Gefäß überführt.

Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 200 µl Chloroform hinzugegeben, die Proben ca. 15 sec gevortext und wiederum für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Eine anschließende Zentrifugation bei 13000 U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur führte zur Trennung der Proben in 3 Phasen. Die RNA war in der wässrigen Phase enthalten, die DNA in der organischen Phenol-Chloroform-Phase und in der Interphase, die Proteine befanden sich ebenfalls in der organischen Phase. Die obere farblos-wässrige Phase, in der sich die RNA anreicherte, wurde abpipettiert und in ein neues 1,2 ml Gefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit je 500 µl Isopropanol, wobei die Proben gevortext, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 13000 U/min bei 4°C 10 min lang zentrifugiert wurden.

Der Isopropanolüberstand wurde abgossen, das erhaltene RNA-Pellet je zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Vortexen gewaschen und jeweils für 10 Minuten bei 4°C mit 13000 U/min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.6 RNA Aufreinigung und RNase-free DNase Behandlung

Um Kontaminationen durch genomische DNA zu vermeiden, wurde die isolierte RNA einem DNase-Verdau unterzogen. Die Aufreinigung der RNA und die DNase Behandlung erfolgten mit einem kommerziellen Kit (RNeasy Mini Kit, QIAGEN).

Zu je 100 µl RNA-Lösung wurden 350 µl RLT Puffer zugegeben, der zuvor mit 10 µl 2-Mercaptoethanol pro Milliliter versetzt worden war, und durch Invertieren gemischt. Nachdem die Lösung um 250 µl 100% Ethanol ergänzt und durch Invertieren gemischt worden war, wurde der gesamte Ansatz von 700 µl auf eine RNeasy-Säule gegeben und bei Raumtemperatur mit 10000 U/min eine Minute lang zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

Um die Säule zu waschen, wurden auf diese 350 µl RW1 Puffer pipettiert. Die Säulen wurden anschließend eine Minute bei Raumtemperatur und 10000 U/min zentrifugiert, das Eluat verworfen.

Inzwischen wurde die DNase Behandlung vorbereitet. Hierzu wurden zu je 10 µl DNase Stammlösung pro Probe 70 µl RDD Puffer hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Das erhaltene DNase Inkubationsgemisch von insgesamt je 80 µl pro Probe wurde auf die Fritte der Säule getropft und circa 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Säulen nochmals mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen, eine Minute bei Raumtemperatur mit 10000 U/min zentrifugiert und das Eluat verworfen.

Nachdem die Säulen in neue 2 ml Sammelröhrchen gesetzt worden waren, erfolgten zwei Waschvorgänge. Dazu wurden zweimal jeweils 500 µl RPE Puffer, der zuvor mit 100% Ethanol versetzt worden war, hinzugegeben, die Proben eine Minute bei Raumtemperatur mit 10000 U/min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Um die Säulen zu trocknen und etwaige RPE Puffer Rückstände zu eliminieren, erfolgte ein zweiminütiges Zentrifugieren bei 13000 U/min. Hierauf wurden die Säulen in neue 1,5 µl Gefäße gesetzt, je 30 µl RNase-freies Wasser dazu gegeben und für 2 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. In diesen 30 µl Eluat befand sich nun die gereinigte RNA. Diese wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7 RNA-Konzentrationsmessung und cDNA-Synthese

Die Konzentration (in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) der gereinigten RNA wurde mittels Photometer in einer Quarzküvette (1:100 Verdünnung, 100 μl Volumen) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei entspricht eine E_{260} von 1 ca. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA. Zur Beurteilung der Reinheit der RNA oder einer etwaigen Kontamination mit DNA erfolgte ebenso die Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der $E_{260/280}$ Quotient gibt Aufschluss über die Reinheit der isolierten RNA und sollte bei 1,6 bis 1,8 liegen.

Für die Synthese der cDNA wurde eine Menge von 1 μg RNA eingesetzt. Die cDNA Synthese erfolgte nach dem Protokoll des iScript™ cDNA Synthesis Kits (BioRad) und mittels GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems PE).

Zu einem μg RNA wurden 4 μl iScript Reactions-Mix, bestehend aus Oligo (dT) und Random hexamer Primers, und 1 μl iScript Reverse Transcriptase zugegeben. Letztere ist eine modifizierte MMLV-Reverse Transcriptase in Kombination mit einem RNase Inhibitor. Der Reaktionsansatz wurde nun mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufpipettiert.

Bei jeder cDNA Synthese wurde eine interne Negativkontrolle mitgeführt, bestehend aus 15 μl Wasser, 4 μl iScript Reactions-Mix und 1 μl iScript Reverse Transcriptase.

Im GeneAmp® PCR System 9700 wurden die Proben 5 Minuten bei 25° C inkubiert, daraufhin 30 Minuten bei 42° C gehalten und 5 Minuten auf 85° C erwärmt. Schließlich folgte das Abkühlen der Proben auf 4° C. Die entstandene cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20° C aufbewahrt.

2.2.8 Real-time RT-PCR

Um die *camp*-Expression der verschiedenen Kolonepithelzellen nach Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃, Butyrat und Intestamin® zu analysieren, wurde ein Real-time RT-PCR (real time semiquantitative reverse polymerase chain reaction) Protokoll etabliert. Die Bestimmung der Expression von LL-37 und des Housekeeping Gens Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, GAPDH, erfolgte mittels iCycler (BioRad, München, Deutschland).

In 15 ml Tubes wurde Mastermix für GAPDH und LL-37 jeweils unterschiedlich angesetzt. Für GAPDH wurden 12,5 µl Universal Mastermix (Absolute™QPCR Mix, Abgene, Surrey, UK) mit 1,25 µl Human GAPDH G3 (20x) (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und 11,25 µl RNase freiem Wasser gemischt. Dabei wurde das GAPDH-PDAR-Housekeeping Kit (Applied Biosystems) verwendet, das keine GAPDH Pseudogene amplifiziert. Für LL-37 wurden 12,5 µl Universal Mastermix (Absolute™QPCR Mix, Abgene) mit 2,5 µl Forward Primer (2 µM), 2,5 µl Reverse Primer (2 µM), 2,5 µl Probe (1 µM), und 5 µl RNase freiem Wasser gemischt.

Forward und Reverse Primer, die für die Quantifizierung der mRNA von LL-37 konstruiert worden waren, wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Forward Primer hatte die Sequenz 5'-ACC CAG CAG GGC AAA TCT C-3', der Revers Primer 5'- GAA GGA CGG GCT GGT GAA G-3'. Die TaqMan-Fluoreszenzsonde für *camp* war 5'- TGT TAT CCT TAT CAC AAC TGA T-3' FAM-markiert (Applied Biosystems).

Vom Mastermix, der für alle Proben zusammen in 15 ml Tubes angesetzt wurde, wurden nun jeweils 96 µl in Sammelröhrchen pipettiert. Nach dem Protokoll von LL-37 wurden dazu je 4 µl cDNA gegeben, so dass sich 100 µl Lösung in jedem Sammelröhrchen befanden. Für den Ansatz von GAPDH wurden je 2 µl cDNA hinzu pipettiert und je 2 µl RNase freies Wasser, so dass sich ebenfalls 100 µl Lösung ergaben. Die Tubes wurden gevortext und bei max. 3000 U/min zentrifugiert. Nun wurden von den Proben je 25 µl nach einem festgelegten Schema in eine 96-Well Optical Reaction Plate mit Barcode (Code 128) (Applied Biosystems) pipettiert. Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren zu minimieren, wurden alle Werte in Triplets bestimmt.

Daraufhin wurden Optical-Caps (8Caps/Stripe) (Applied Biosystems) aufgesetzt und festgedrückt. Damit die gesamte Flüssigkeit während der Messung am Boden der Tubes lag, wurden die Proben kurz vor Beginn des PCR Laufs zentrifugiert.

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Schema:

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing und Elongation	60 °C	1 min
Aufbewahrung	4 °C	

Tabelle 2: PCR-Zyklusabfolge

Das Protokoll für LL-37 sah 50 Zyklen vor. Die Proben waren FAM (Fluorescein) markiert und wurden bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Amplifikation für GAPDH umfasste 40 Zyklen. Die Reporterfluoreszenz wurde bei der Wellenlänge für VIC, 530 nm, gemessen.

Bei der RT-PCR erfolgt die Amplifikation des DNA-Fragmentes unter Verwendung einer Oligonukleotid- Sonde, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist und an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet. Wenn sich die beiden Fluoreszenzfarbstoffe der Probe in räumlicher Nähe zueinander befinden, wird nach Anregung durch einen Argon-Laser die Energie des Reporterfarbstoffes auf den Quencherfarbstoff übertragen und nur letzterer emittiert Licht. Während der Amplifikation spaltet die Taq-Polymerase mit ihrer 5' nukleolytischen Aktivität die Sonde, wodurch eine räumlichen Trennung entsteht und kein Energietransfer mehr stattfinden kann. Die Stärke der Reporterfluoreszenz nimmt zu, die des Quenchers ab. Die Stärke der Fluoreszenz des Reporters ist proportional zur Menge der gebildeten DNA.

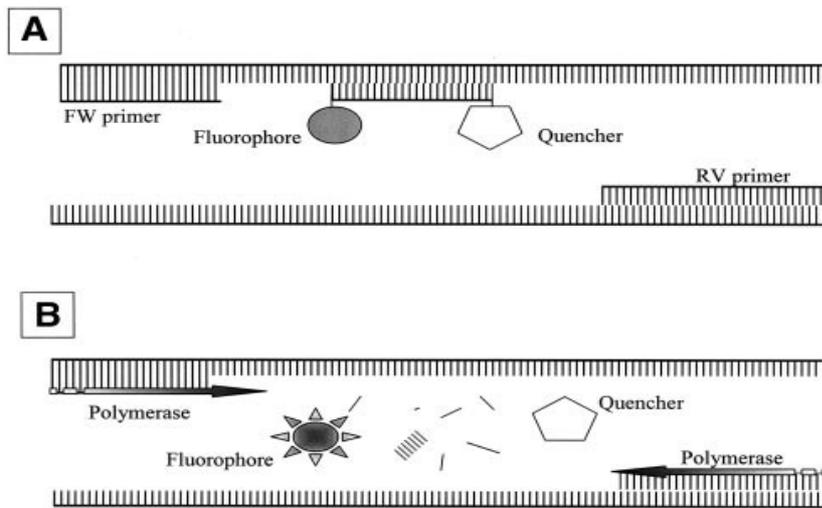


Abb. 3: RT-PCR. A: Nach der Denaturierung bindet die Sonde zwischen den beiden Primern. Da sich Reporter, hier Fluorophore genannt, und Quencher in räumlicher Nähe zueinander befinden, kann der Energietransfer zwischen beiden stattfinden. B: Während der Amplifikation wird die Sonde durch die 5' → 3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gespalten. Die räumliche Trennung zwischen Reporter und Quencher bewirkt die Fluoreszenz Emission des Reporters. FW: Forward Primer, RV: Reverse Primer. Nach Giulietti et al¹⁸⁷.

Der Punkt, an dem die Reporterfluoreszenz in der exponentiellen Phase der PCR die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, wird Threshold (dt. Schwellenwert) genannt, der dazugehörige PCR-Zyklus Threshold Cycle oder C_T -Wert¹⁸⁸. Dieser C_T -Wert dient der Quantifizierung, da das mRNA Ausgangsniveau mit ihm korreliert. Die Bestimmung der Expression von *camp* und GAPDH in den unbekanntenen Proben erfolgte durch Festlegung des C_T -Wertes.

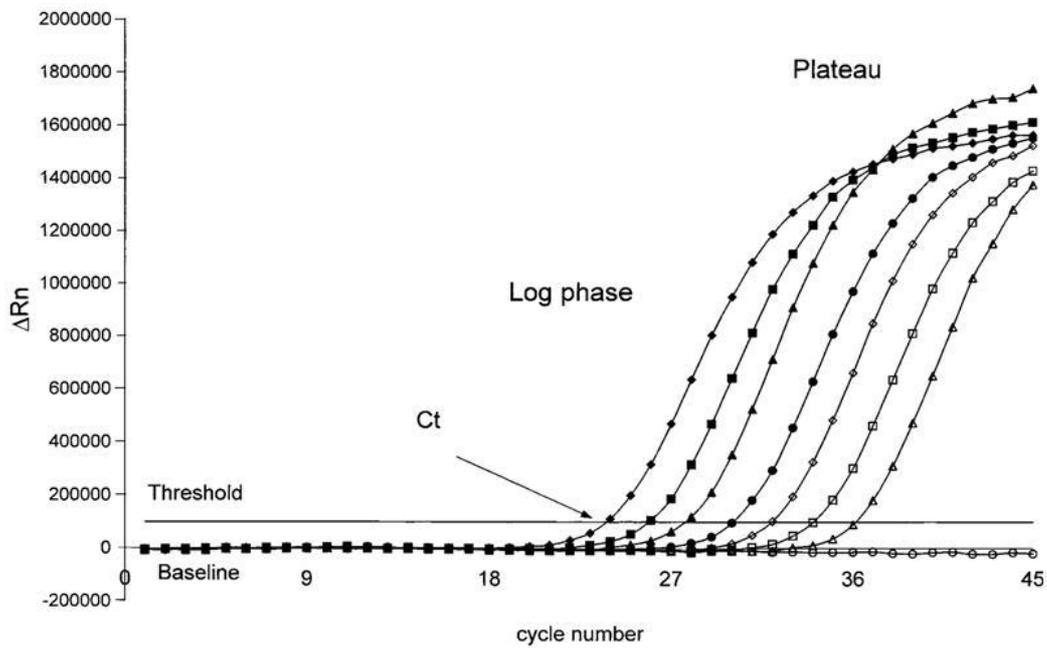


Abb. 4: C_T -Wert. Aufgrund geringer Templatekonzentrationen ist zu Beginn eines PCR-Laufes die Reporterfluoreszenz nicht detektierbar. Es wird nur die Hintergrundfluoreszenz gemessen, die Baseline. Der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt, heisst C_T -Wert. Nach Giulietti et al¹⁸⁷.

Die Induktion der *camp*-Expression wurde relativ zur GAPDH-Kontrolle bestimmt, wobei die $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ Methode verwendet wurde. Dabei gilt:

$$\Delta C_t = \Delta C_t(\text{stimulant}) - \Delta C_t(\text{vehicle})$$

mit

$$\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Cathelicidin}) - \Delta C_t(\text{GAPDH})$$

2.2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden mittels Microsoft Excel (Redmont, USA) und der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode berechnet und in verschiedenen Diagrammen dargestellt. Dabei bildeten die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten die Grundlage der Auswertungen. Der studentische t-Test (Student's T-Test) wurde für die Berechnung der Signifikanz zwischen Mess- und Kontrollwerten (markiert mit *, bzw. ***) oder Messwerten untereinander (markiert mit °, bzw. °°°) verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$ und $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Vitamin D₃ auf die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen

3.1.1 Induktion der *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit Vitamin D₃

Inkubiert man HT 29 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 1,25(OH)₂D₃, kommt es zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion der *camp*-Expression.

HT 29 Zellen wurden mit 1, 7,5, 15, 25 und 50 nM Vitamin D₃ für jeweils 8, 24 und 48 Stunden kultiviert. Eine Behandlung mit 1 nM Vitamin D₃ über 48 Stunden zeigt eine signifikante Erhöhung der *camp*-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ($p < 0,05$). Die Inkubation mit 15 nM Vitamin D₃ resultiert in einer signifikanten Induktion der *camp*-Expression bei einer Inkubationszeit von 8 bzw. 48 Stunden, nach 24 Stunden zeigt sich eine hochsignifikante Induktion der *camp*-Expression ($p < 0,001$). Eine Behandlung der HT 29 Zellen mit 25 nM Vitamin D₃ zeigt die Auswirkungen auf das *camp*-Gen am deutlichsten. Sie bewirkt für 8 und 48 Stunden eine signifikante, für 24 Stunden eine hochsignifikante Induktion der *camp*-Expression.

Eine Inkubation der Zellen mit 50 nM Vitamin D₃ führt zu einem raschen Abfall der Expression des *camp*-Gens im Vergleich zu einer Behandlung der Zellen mit 25 nM Vitamin D₃. Nach der Behandlung der Zellen mit 50 nM Vitamin D₃ wurden tote Zellen in der Zellkultur und photometrisch ein verringerter RNA-Gehalt der Zellen festgestellt.

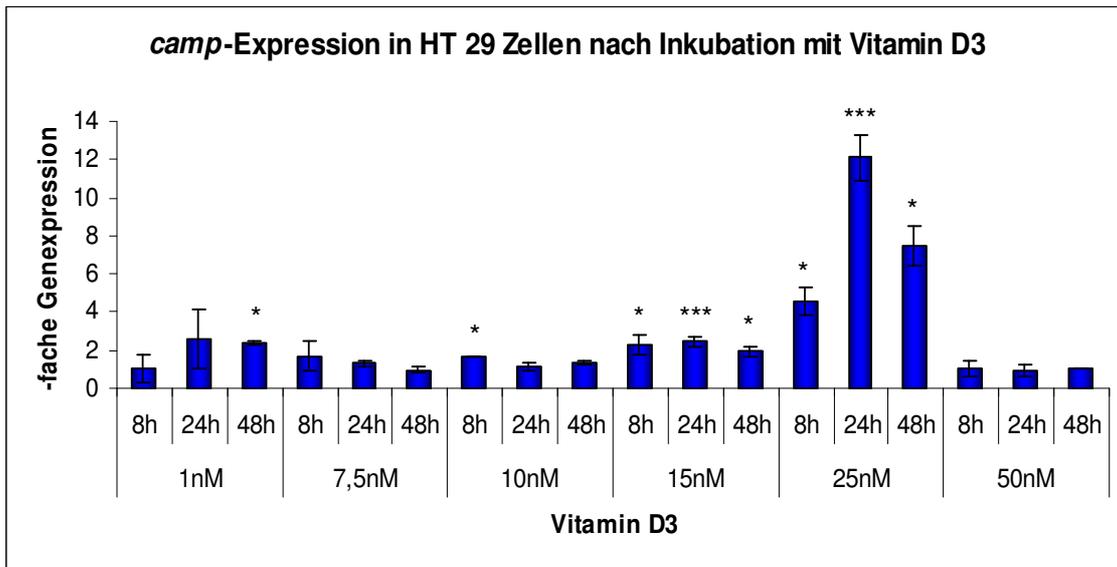


Abb. 5: *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. HT 29 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an Vitamin D_3 inkubiert. Die Bestimmung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH und wurde in Bezug zu den mit Medium behandelten Kontrollzellen gesetzt. Werte sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$, Student's T-Test).

3.1.2 Induktion der *camp*-Expression in SW 480 Zellen nach Inkubation mit Vitamin D₃

Behandelt man SW 480 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 1,25(OH)₂D₃, zeigt sich für 1, 7,5 und 10 nM Vitamin D₃ eine geringe Induktion der *camp*-Expression im Vergleich zu mit Medium behandelten Kontrollzellen. Für 15 nM Vitamin D₃ zeigt sich eine signifikante bzw. hochsignifikante Erhöhung der *camp*-Expression. Eine Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃ über 24 Stunden bewirkt eine 64-fache Genexpression im Vergleich zu mit Medium behandelten Kontrollzellen. Bei einer Konzentration von 50 nM Vitamin D₃ zeigen sich sehr niedrige Level der Expression des *camp*-Gens.

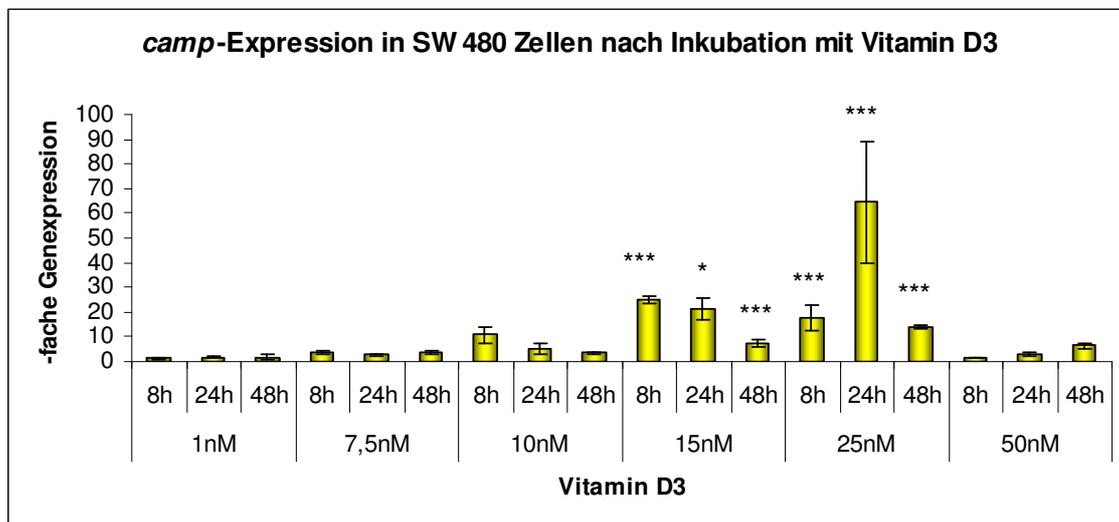


Abb. 6: *camp*-Expression in SW 480 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH)₂D₃. SW 480 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an Vitamin D₃ inkubiert. Die Bestimmung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH und wurde in Bezug zu den mit Medium behandelten Kontrollzellen gesetzt. Werte sind als Mittelwerte ± SD dargestellt (*:p<0,05; ***:p<0,001, Student's T-Test).

3.1.3 Induktion der *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit Vitamin D₃

Die Inkubation von T 84 Zellen mit 1,25(OH)₂D₃ bewirkt bei einer Konzentration von 7,5 nM Vitamin D₃ eine signifikante bzw. hochsignifikante Erhöhung der *camp*-Expression gegenüber Kontrollzellen, die im Medium kultiviert wurden. Eine Behandlung mit 25 nM Vitamin D₃ über 24 Stunden zeigt den größten Effekt. Bei 50 nM Vitamin D₃ lässt sich keine Induktion der *camp*-Expression nachweisen. Dieser Abfall der *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Behandlung mit 50 nM Vitamin D₃ korreliert mit dem gesteigerten Anteil an toten Zellen, der bereits in der Zellkultur beobachtet werden konnte. Die toten Zellen werden in der Kultur durch Absaugung eliminiert.

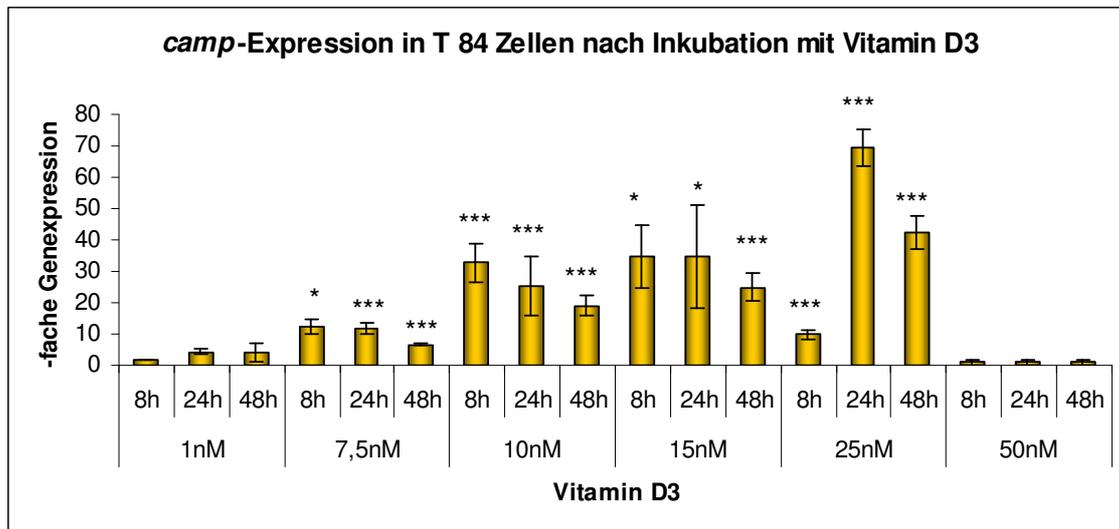


Abb. 7: *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH)₂D₃. T 84 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an Vitamin D₃ inkubiert. Die Bestimmung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH und wurde in Bezug zu den mit Medium behandelten Kontrollzellen gesetzt. Werte sind als Mittelwerte ± SD dargestellt (*:p<0,05; ***:p<0,001, Student's T-Test).

3.1.4 Induktion der *camp*-Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit Vitamin D₃

In der Adenomzelllinie GEKI 02 bewirkt eine Behandlung mit Vitamin D₃ eine Induktion der *camp*-Expression. 25 nM Vitamin D₃ bewirken eine signifikante Erhöhung der Genexpression für *camp*. Für 25 nM Vitamin D₃ über 24 Stunden beträgt die Genexpression das 24-fache im Vergleich zu den mit Medium behandelten Kontrollzellen.

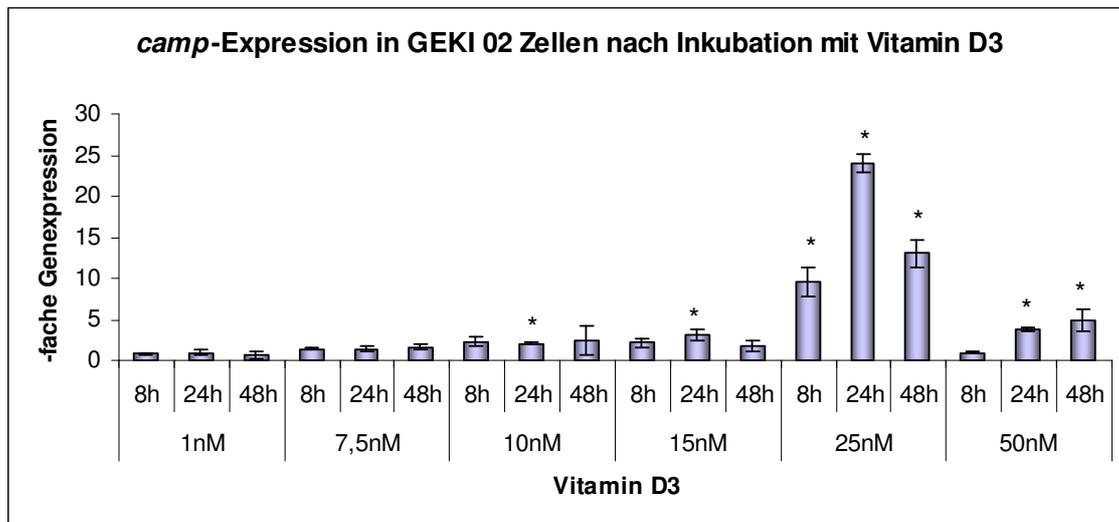


Abb. 8: *camp*-Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH)₂D₃. GEKI 02 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an Vitamin D₃ inkubiert. Die Bestimmung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH und wurde in Bezug zu den mit Medium behandelten Kontrollzellen gesetzt. Werte sind als Mittelwerte ± SD dargestellt (*:p<0,05; ***:p<0,001, Student's T-Test).

3.1.5 Induktion der *camp*-Expression in der Monozytenzelllinie U 937 nach Inkubation mit Vitamin D₃

Die Zellen der Monozytenzelllinie U 937 reagieren empfindlich auf die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an 1,25(OH)₂D₃. Nach einer Behandlung mit 1 nM Vitamin D₃ erhält man hochsignifikante Ergebnisse. Mit 10 nM Vitamin D₃ lässt sich eine Steigerung erzielen. Bei einer Behandlung mit 15 und 25 nM Vitamin D₃ wird die Induktion der *camp*-Expression rückläufig. Bei 50 nM Vitamin D₃ ist im Vergleich zu den Kontrollzellen keine erhöhte Genexpression mehr feststellbar. Dies korreliert wiederum mit dem photometrisch gemessenen erniedrigten RNA-Gehalt der Zellen aufgrund eines vermehrten Anteils toter Zellen in der Zellkultur nach einer Behandlung der Zellen mit 50 nM Vitamin D₃.

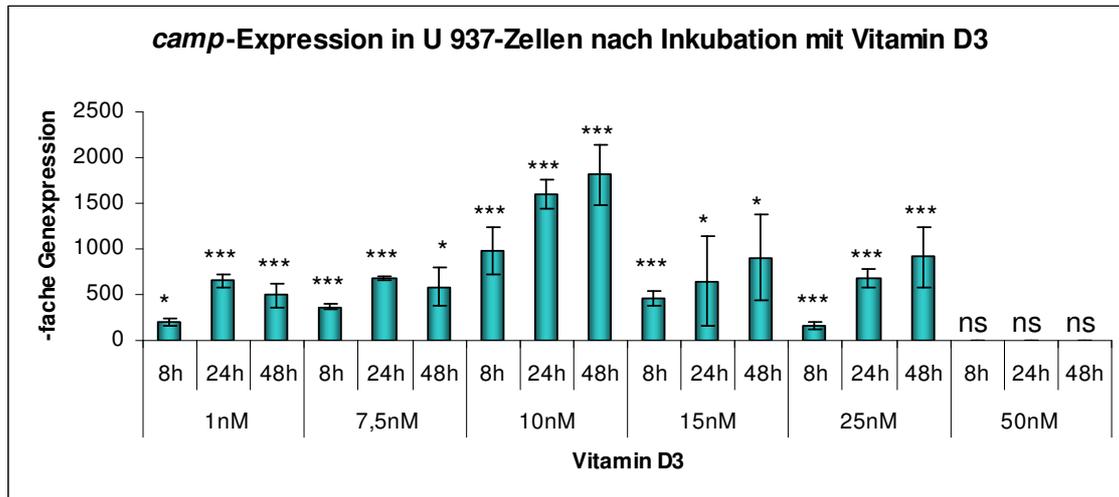


Abb. 9: *camp*-Expression in U 937 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH)₂D₃. U 937 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an Vitamin D₃ inkubiert. Die Bestimmung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH und wurde in Bezug zu den mit Medium behandelten Kontrollzellen gesetzt. Werte sind als Mittelwerte ± SD dargestellt (*:p<0,05; ***:p<0,001, Student's T-Test).

3.1.6 Zusammenstellung: *camp*-Expression in Kolonzellen nach Inkubation mit Vitamin D₃

Die Genexpression des *camp*-Gens wird durch Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ induziert. Die stärkste Induktion der *camp*-Expression wird in den meisten Zelllinien durch eine Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃ erreicht. Eine Behandlung der Zellen über 24 Stunden zeigt eine signifikante bis hochsignifikante Steigerung der Genexpression gegenüber einer Behandlung über 8 Stunden. Dagegen zeigt die Inkubation der Zellen für 48 Stunden verglichen mit einer Inkubation über 8 Stunden unterschiedliche Effekte hinsichtlich einer gesteigerten Genexpression.

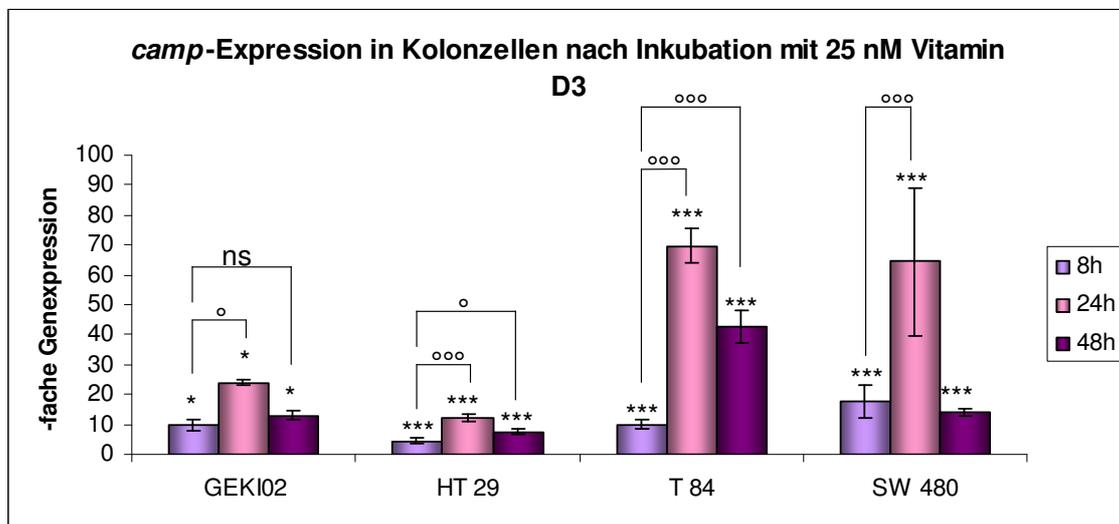


Abb. 10: *camp*-Expression in Kolonzellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃. Die Zellen der Zelllinien GEKI 02, HT 29, T 84 und SW 480 wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit 25 nM Vitamin D₃ inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD. (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; Student's T-Test, in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen). (°: $p < 0,05$; °°°: $p < 0,001$; Student's T-Test, in Bezug auf mit Vitamin D₃ behandelte Zellen).

3.2 Einfluss von Butyrat auf die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen

Die kurzkettige Fettsäure Butyrat induziert bekanntermaßen die Expression des *camp*-Gens in epithelialen Kolonzellen^{103, 105}. Um diese Ergebnisse nachzuvollziehen, wurden verschiedene Zelllinien über 8, 24 und 48 Stunden mit einer Dosis von 4 mM Butyrat inkubiert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-time PCR ausgewertet. Eine Behandlung mit 4 mM Butyrat über 48 Stunden hat die stärkste Auswirkung auf die Expression des *camp*-Gens. Verglichen mit einer Behandlung über 8 bzw. 24 Stunden zeigt sich in fast allen Zelllinien eine hochsignifikante Steigerung der Genexpression.

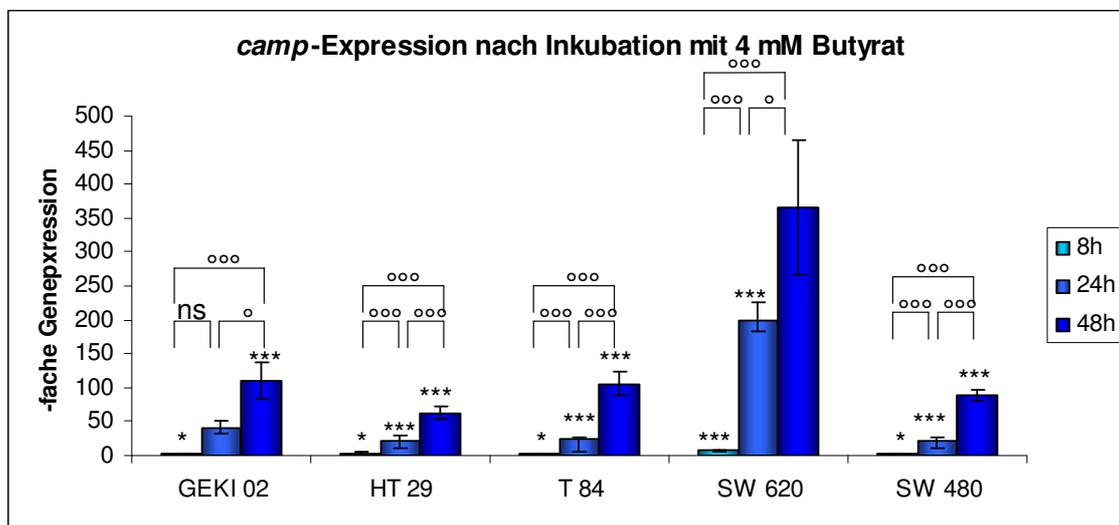


Abb. 11: *camp*-Expression in Kolonzellen nach Inkubation mit 4 mM Butyrat. Die Zellen der Zelllinien GEKI 02, HT 29, T 84, SW 620 und SW 480 wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit 4 mM Butyrat inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD. (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; Student's T-Test; in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen). (°: $p < 0,05$; °°°: $p < 0,001$; Student's T-Test; in Bezug auf mit Butyrat behandelte Zellen).

3.3 Einfluss der Co-Stimulation mit Vitamin D₃ plus Butyrat auf die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen

3.3.1 Auswirkungen der Co-Stimulation auf die Adenomzelllinie GEKI 02

Wie bisher gezeigt wurde, lässt sich in Kolonepithelzellen eine Steigerung der Expression des *camp*-Gens durch eine Behandlung mit den Substanzen Vitamin D₃ und Butyrat erzielen.

Dabei bewirken 25 nM 1,25(OH)₂D₃ bzw. 4 mM Butyrat die stärkste Induktion der *camp*-Expression. Um zu analysieren, ob eine Co-Stimulation der Kolonepithelzellen mit 25 nM Vitamin D₃ plus 4 mM Butyrat eine weitere Steigerung der Genexpression gegenüber einer Behandlung mit den Einzelsubstanzen bewirkt, kultivierten wir GEKI 02 Zellen für 8, 24 und 48 Stunden mit beiden Substanzen.

Eine Inkubation von GEKI 02 Zellen mit 25 nM Vitamin D₃ über 24 Stunden führt zu einer 24-fachen, die Inkubation mit 4 mM Butyrat zu einer 41-fachen, die Koinkubation 1,25(OH)₂D₃ plus Butyrat zu einer 62-fachen Genexpression gegenüber unbehandelten Kontrollzellen. Die Koinkubation mit beiden Substanzen über 24 Stunden bewirkt demnach eine hochsignifikante Steigerung der *camp*-Expression gegenüber der Behandlung mit der Einzelsubstanz Vitamin D₃, jedoch nicht gegenüber der Behandlung mit Butyrat.

Inkubiert man GEKI 02 Zellen über 48 Stunden mit 25 nM Vitamin D₃, erzielt man eine 13-fache Expression des *camp*-Gens, inkubiert man sie mit 4 mM Butyrat, erhält man eine 111-fache Genexpression, behandelt man sie mit beiden Substanzen, erzielt man eine 152-fache Genexpression gegenüber unbehandelten Kontrollzellen. Eine Koinkubation mit Vitamin D₃ plus Butyrat über 48 Stunden bewirkt eine hochsignifikante Steigerung der Expression des *camp*-Gens gegenüber beiden Einzelsubstanzen.

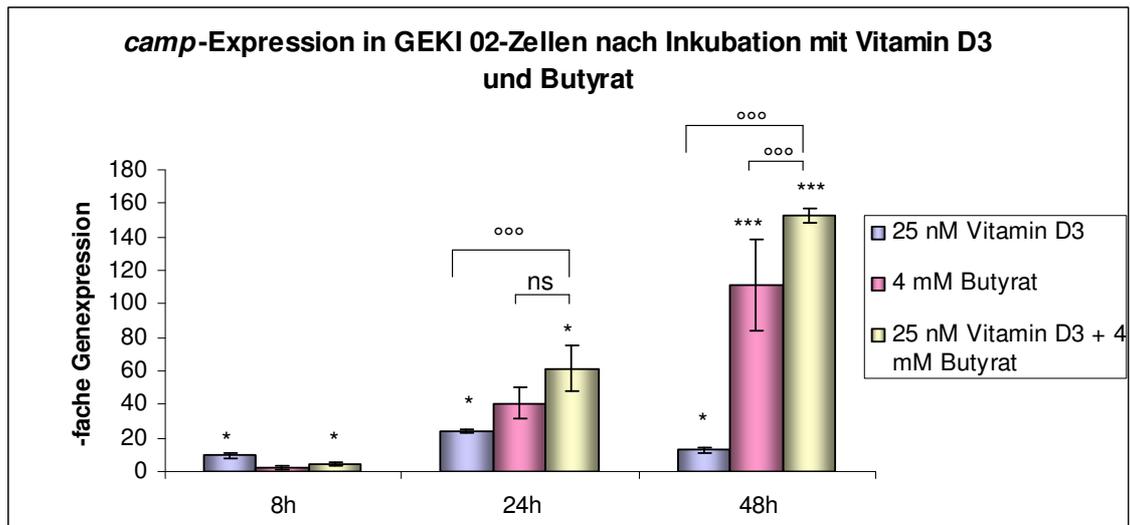


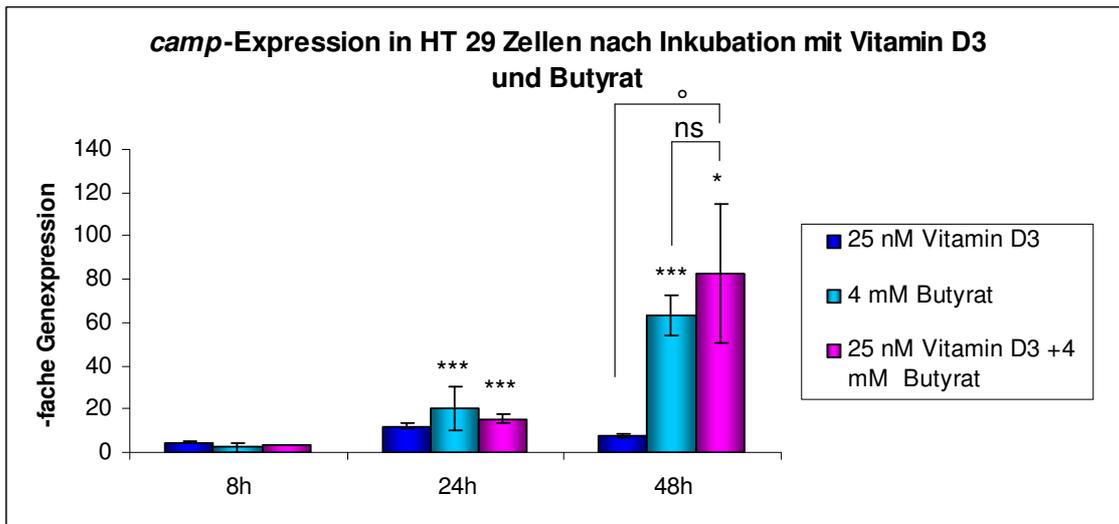
Abb. 12: *camp*-Expression in GEKI 02 nach Koinkubation mit 25 nM 1,25(OH)₂D₃ und 4 mM Butyrat.

GEKI 02 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit 25 nM Vitamin D₃, 4 mM Butyrat und 25 nM Vitamin D₃ plus 4 mM Butyrat kultiviert. Die Auswertung erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD. (*: p<0,05; ***: p<0,001; Student's T-Test; in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen). (°:p<0,05; °°°:p<0,001; Student's T-Test; in Bezug auf mit Vitamin D₃ bzw. Butyrat behandelte Zellen).

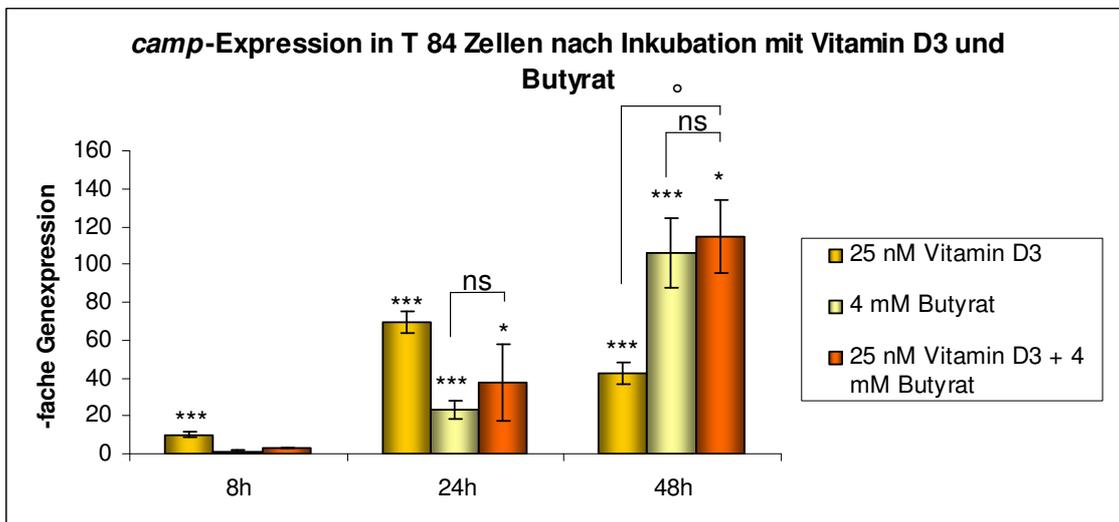
3.3.2 Auswirkungen der Co-Stimulation auf die Karzinomzelllinien HT 29, SW 480 und T 84

Die Karzinomzellen der Linien HT 29, SW 480 und T 84 reagieren auf die Koinkubation mit 25 nM Vitamin D₃ plus Butyrat nicht mit einer gesteigerten *camp*-Expression im Vergleich zur Behandlung mit beiden Einzelsubstanzen.

A



B



C

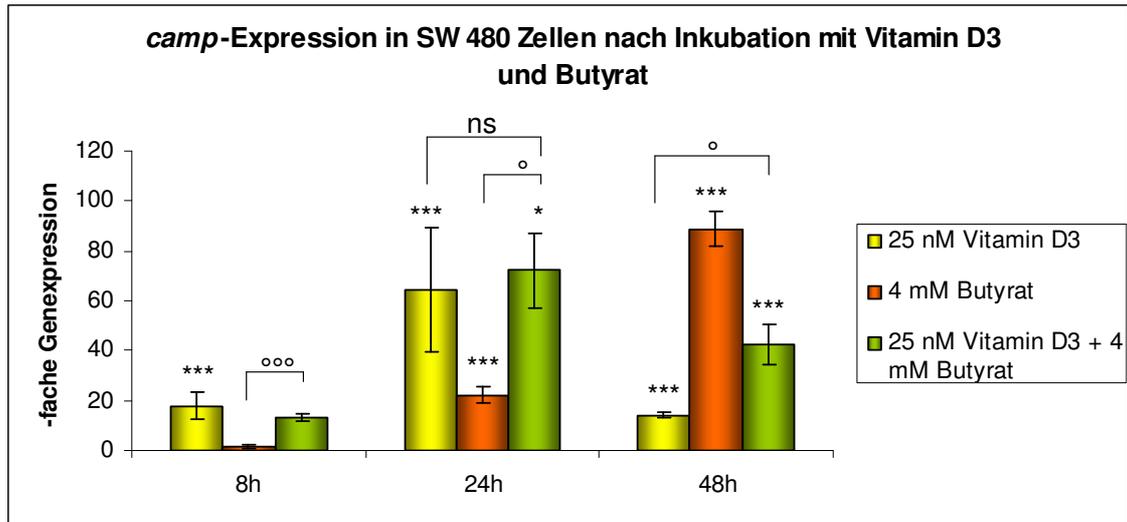


Abb. 13: A: *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃ und 4 mM Butyrat.

B: *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃ und 4 mM Butyrat

C: *camp*-Expression in SW 480 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃ und 4 mM Butyrat

Die Zellen der Zelllinien HT 29, T 84 und SW 480 wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit 25 nM Vitamin D₃, 4 mM Butyrat und 25 nM Vitamin D₃ plus 4 mM Butyrat kultiviert. Die Auswertung erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD. (*: p<0,05; ***: p<0,001; Student's T-Test; in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen). (°:p<0,05; °°°:p<0,001; Student's T-Test; in Bezug auf mit Vitamin D₃ bzw. Butyrat behandelte Zellen).

In HT 29 Zellen führt die Behandlung mit 25 nM Vitamin D₃ über 48 Stunden zu einer 7-fachen, die mit 4 mM Butyrat zu einer 63-fachen und die mit Vitamin D₃ plus Butyrat zu einer 83-fachen Genexpression in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen. Die Koinkubation mit beiden Substanzen bewirkt eine signifikante Erhöhung der *camp*-Expression im Vergleich zur Inkubation mit Vitamin D₃, nicht jedoch bezogen auf die Behandlung mit Butyrat.

Gleiches gilt für T 84 Zellen. Durch die Behandlung mit 25 nM Vitamin D₃ über 48 Stunden erreicht man eine 43-fache, durch die Inkubation mit 4 mM Butyrat eine 106-fache, durch die Behandlung mit beiden Substanzen eine 114-fache Expression des *camp*-Gens bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen. Verglichen mit der Kultivierung

der Zellen mit Vitamin D₃ bewirkt die Koinkubation Vitamin D₃ plus Butyrat eine signifikante Steigerung der *camp*-Expression, in Bezug auf die Behandlung mit Butyrat allerdings nicht. Eine Co-Stimulation mit Vitamin D₃ plus Butyrat kann auch über 24 Stunden keine weitere Steigerung der Genexpression erzielen, verglichen mit einer Inkubation mit den Einzelsubstanzen.

Auf die Zelllinie SW 480 hat eine Co-Stimulation keinen Einfluss. Nach 8 Stunden wird durch die Behandlung der Zellen mit 25 nM 1,25(OH)₂D₃ plus Butyrat gegenüber einer Behandlung mit 4 mM Butyrat eine hochsignifikante Steigerung der *camp*-Expression erreicht, nicht jedoch gegenüber einer Behandlung mit 25 nM 1,25(OH)₂D₃. Analog zeigt sich nach einer 24-stündigen Co-Stimulation der Zellen mit Vitamin D₃ plus Butyrat eine signifikante Erhöhung der Expression des Cathelicidin Gens verglichen mit einer Kultivierung der Zellen mit Butyrat, verglichen mit einer Inkubation der Zellen mit Vitamin D₃ allerdings nicht.

Nach 48 Stunden führt die Behandlung mit 25 nM Vitamin D₃ zu einer 14-fachen, die mit 4 mM Butyrat zu einer 89-fachen und die mit Vitamin D₃ plus Butyrat zu einer 42-fachen Genexpression in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen. Die Koinkubation mit Vitamin D₃ plus Butyrat erreicht eine signifikante Steigerung der *camp*-Expression in Bezug auf die Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃, nicht jedoch in Bezug auf eine Behandlung der Zellen mit 4 mM Butyrat.

Ergebnisse

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

		25 nM Vitamin D ₃	4 mM Butyrat	25 nM Vitamin D ₃ plus 4 mM Butyrat
HT 29 Zellen	8h	4,5	2,4	3,2
	24h	12,1	20,2	15,6
	48h	7,4	63,2	82,7 [■]
T 84 Zellen	8h	9,8	1,4	2,51
	24h	69,6	23,3	37,7
	48h	42,5	105,9	114,4 [■]
SW 480 Zellen	8h	17,7	1,5	13,1 ^{□□□}
	24h	64,5	22,3	72,4 [□]
	48h	14,0	88,9	42,2 [■]

Tabelle 3: -fache Genexpression in Kolonepithelzellen in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃, 4 mM Butyrat und 25 nM Vitamin D₃ plus 4 mM Butyrat. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte. Signifikanzniveau $p < 0,05$ und $p < 0,001$. Student's T-Test; [■], ^{■■■}: in Bezug auf mit Vitamin D₃ behandelte Zellen; [□], ^{□□□}: in Bezug auf mit Butyrat behandelte Zellen.

3.4 Einfluss von Intestamin[®] auf die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen

3.4.1 Induktion der *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit Intestamin[®]

In HT 29 Zellen erweist sich Intestamin[®] als starker Induktor der *camp*-Expression. Geringe Konzentrationen von Intestamin[®], nämlich 1,25%, führen über 24, bzw. 48 Stunden zu einer hochsignifikanten Steigerung der Genexpression verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Gleiches zeigt sich bei einer Konzentration von 2,5% Intestamin[®]. Eine Behandlung mit 5% Intestamin[®] bewirkt über 24 Stunden eine 30-fache Genexpression in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen.

Inkubiert man HT 29 Zellen mit 10% Intestamin[®], zeigt sich die stärkste Induktion der *camp*-Expression. Nach 8, 24 bzw. 48 Stunden erhält man eine 2-, 32- bzw. 79-fache Genexpression gegenüber unbehandelten Kontrollzellen. Dies entspricht einer hochsignifikanten Steigerung nach 24 Stunden und einer signifikanten Steigerung nach 8 bzw. 48 Stunden.

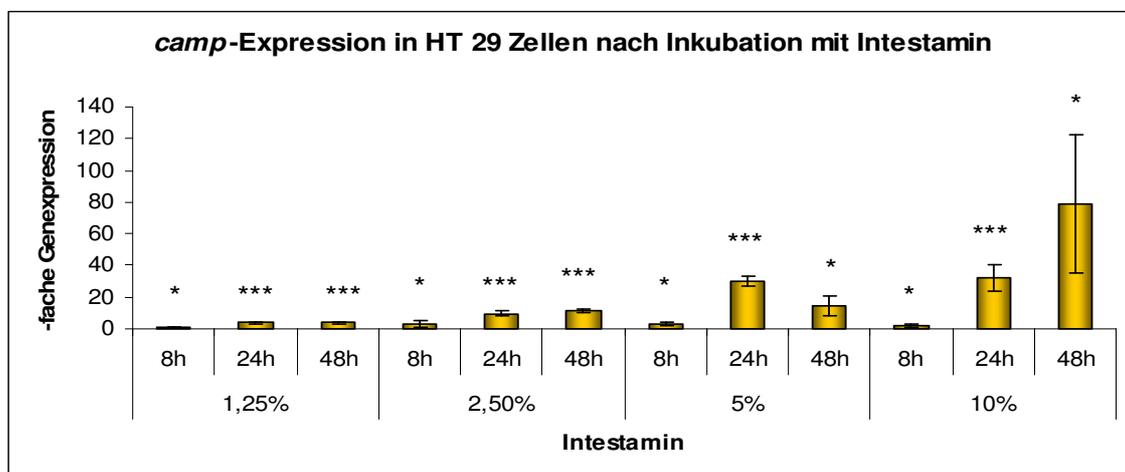


Abb. 14: *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit Intestamin[®]. HT 29 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Intestamin[®] (1,25%, 2,5%, 5% und 10%) inkubiert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH ausgewertet, die Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$, Student's T-Test).

3.4.2 Induktion der *camp*-Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit Intestamin[®]

Eine niedrige, jedoch teils signifikante Expression des *camp*-Gens, zeigt sich, wenn man SW 620 Zellen mit 1,25% oder 2,5% Intestamin[®] über 8, 24 und 48 Stunden inkubiert.

Eine Behandlung mit 5% Intestamin[®] führt nach 8, 24 bzw. 48 Stunden zu einer 8-, 20- bzw. 7-fachen Genexpression von *camp*, was eine signifikante Erhöhung unbehandelten Kontrollzellen gegenüber bedeutet. Eine 166-fache Genexpression wird mit einer Kultivierung von SW 620 Zellen über 48 Stunden mit 10% Intestamin[®] erreicht. Ebenfalls signifikant ist die Erhöhung der *camp*-Expression bei einer Inkubation mit 10% Intestamin[®] über 8 und 24 Stunden (11- und 79-fach).

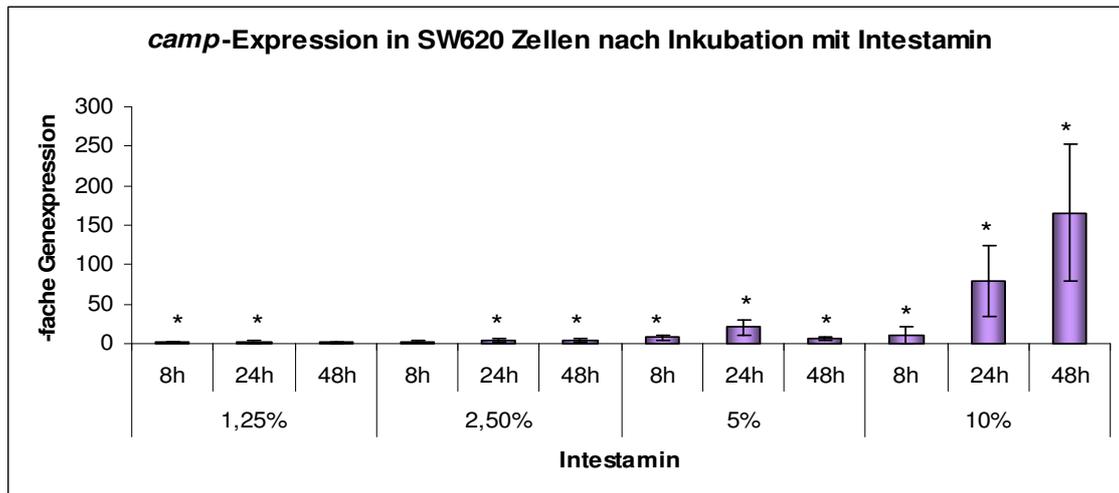


Abb. 15: *camp*-Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit Intestamin[®]. SW 620 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Intestamin[®] (1,25%, 2,5%, 5% und 10%) inkubiert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH ausgewertet, die Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (*:p<0,05; ***:p<0,001, Student's T-Test).

3.4.3 Induktion der *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit Intestamin®

Wie an den kolorektalen Karzinomzelllinien HT 29 und SW 620 bereits gezeigt wurde, bewirkt eine Behandlung mit 10% Intestamin® eine starke Induktion der *camp*-Expression. Dies lässt sich auch an der Zelllinie T 84 zeigen. Inkubiert man T 84 Zellen mit 10% Intestamin®, erhält man nach 24 Stunden eine 13-fache, nach 48 Stunden eine 47-fache Genexpression in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen. Beide Ergebnisse entsprechen einer hochsignifikanten Steigerung des *camp*-Gens.

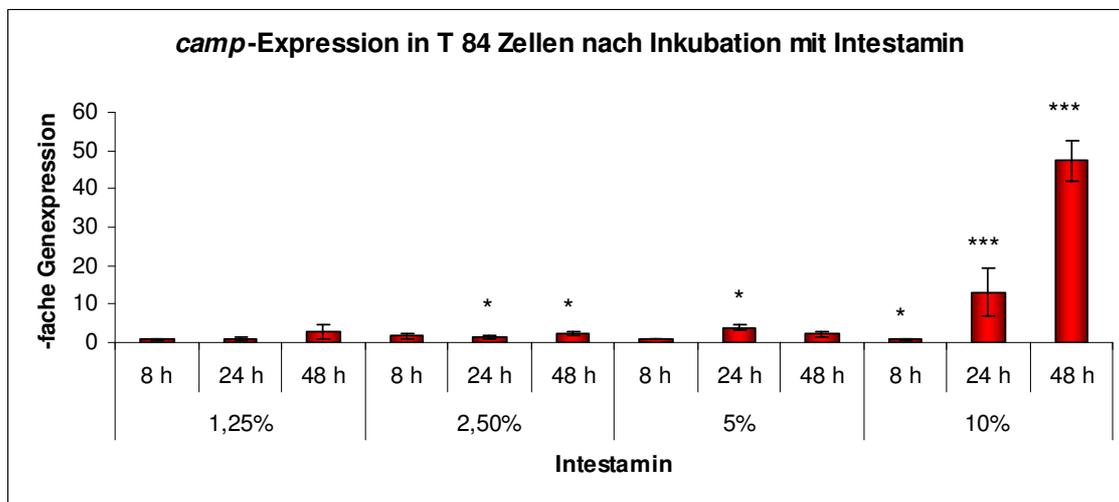


Abb. 16: *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit Intestamin®. T 84 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Intestamin® (1,25%, 2,5%, 5% und 10%) inkubiert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH ausgewertet, die Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (*:p<0,05; ***:p<0,001, Student's T-Test).

3.4.4 Induktion der *camp*-Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit Intestamin®

Die Adenomzelllinie GEKI 02 verhält sich gegenüber einer Behandlung mit Intestamin® ähnlich wie die untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinie HT 29, SW 620 und T 84. Allerdings wird die stärkste Induktion der *camp*-Expression nicht durch die Behandlung mit 10% Intestamin® über 48 Stunden, sondern über 24 Stunden hervorgerufen. Nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 10% Intestamin® ergibt sich eine 33-fache Expression von *camp*, was einer hochsignifikanten Steigerung der Genexpression entspricht. Nach 48 Stunden wird eine 8-fache Genexpression erreicht, was eine signifikante Erhöhung der *camp*-Expression gegenüber unbehandelten Kontrollzellen bedeutet.

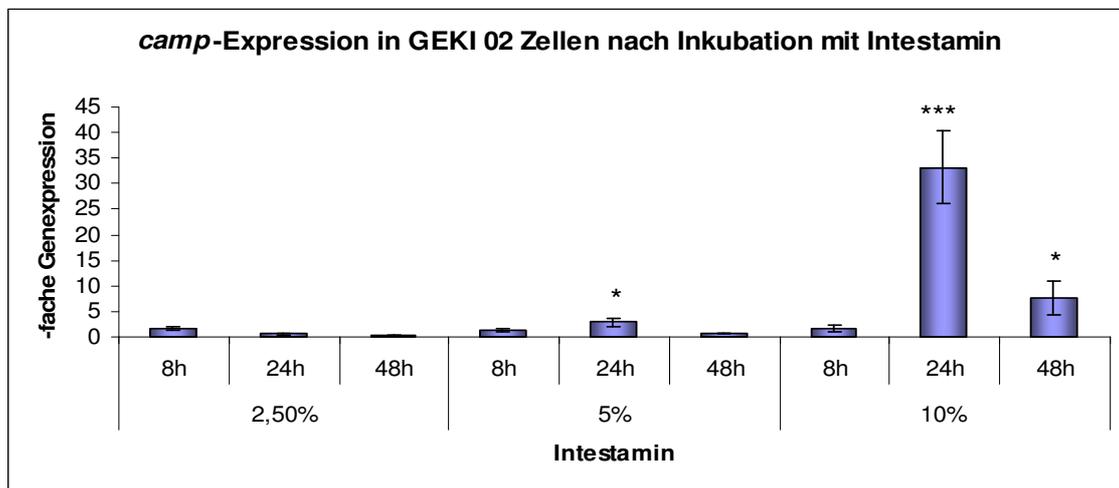


Abb. 17: *camp*-Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit Intestamin®. GEKI 02 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Intestamin® (2,5%, 5% und 10%) inkubiert. Die exprimierte mRNA wurde mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH ausgewertet, die Genexpression in Bezug auf mit Medium behandelte Kontrollzellen graphisch dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$, Student's T-Test).

3.5 Einfluss einer Co-Stimulation mit Intestamin[®] plus Butyrat auf die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen

10% Intestamin[®] und 4 mM Butyrat induzieren, wie die bisherigen Versuche zeigten, die *camp*-Expression in epithelialen Kolonzellen. Kultiviert man T 84 Zellen mit beiden Substanzen, nämlich mit 10% Intestamin[®] plus 4 mM Butyrat, lässt sich jedoch keine deutliche Steigerung der *camp*-Expression gegenüber einer Behandlung mit den einzelnen Substanzen nachweisen. Nach 48 Stunden erzielt die Inkubation mit 10% Intestamin[®] eine 47-fache, mit 4 mM Butyrat eine 106-fache, und mit Intestamin plus Butyrat eine 107-fache Expression des *camp*-Gens im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dies bedeutet, dass eine Co-Stimulation mit Intestamin[®] plus Butyrat zwar eine hochsignifikante Steigerung der Genexpression gegenüber einer Behandlung mit Intestamin[®] bewirkt, jedoch keinerlei Steigerung hinsichtlich einer Behandlung mit Butyrat zeigt.

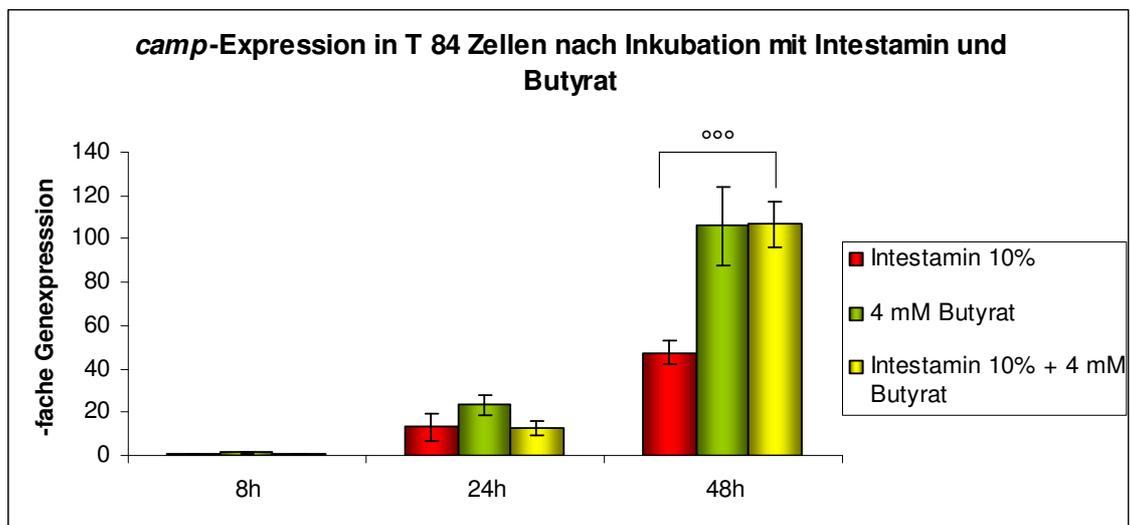


Abb. 18: *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®] und 4mM Butyrat. T 84 Zellen wurden für 8, 24 und 48 Stunden mit 10% Intestamin[®], 4 mM Butyrat und 10% Intestamin[®] plus 4 mM Butyrat kultiviert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD. (ns: nicht signifikant; °: $p < 0,05$; °°: $p < 0,001$; Student's T-Test; in Bezug auf mit Intestamin[®] bzw. Butyrat behandelte Zellen).

3.6 Rolle des MEK/ERK Signalweges

U0126 ist ein spezifischer MEK 1 Inhibitor und wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Rolle des intrazellulären Signalweges MEK/ERK auf die durch 1,25(OH)₂D₃ und Intestamin[®] induzierte *camp*-Expression zu untersuchen.

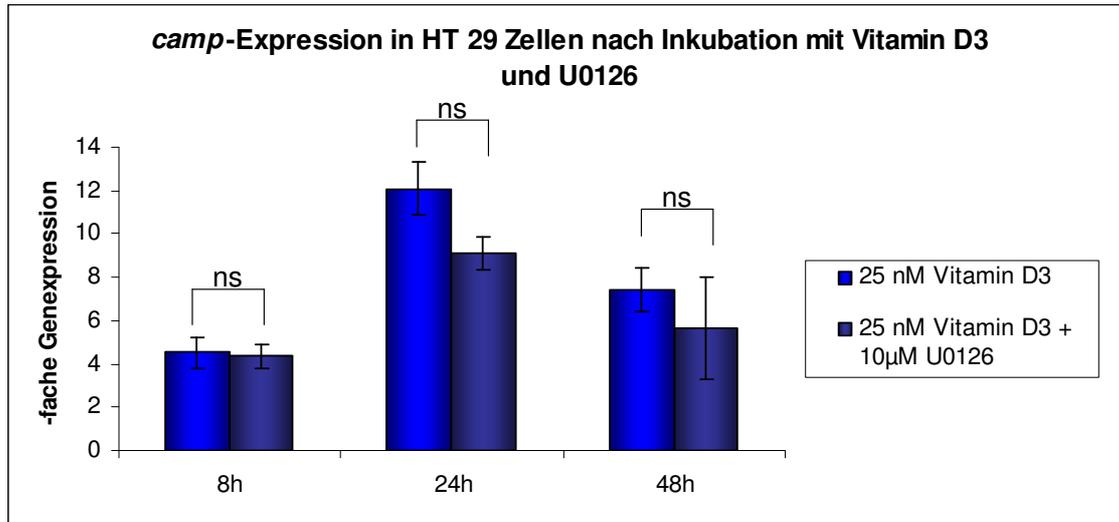
3.6.1 Einfluss des MEK/ERK Signalweges bei der Induktion des *camp*-Gens durch Vitamin D₃

Inkubiert man Zellen der kolorektalen Karzinomzelllinien HT 29, SW 480, T 84 und der Adenomlinie GEKI 02 mit 25 nM Vitamin D₃ plus 10 µM U0126 erhält man keine signifikant geringere Expression des *camp*-Gens als bei einer Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃. Die Behandlung mit dem spezifischen MEK 1 Inhibitor U0126 zeigt, dass der MEK/ERK Signalweg keinen Einfluss auf die Induktion des *camp*-Gens durch 1,25(OH)₂D₃ besitzt.

In HT 29 Zellen bewirkt die Behandlung mit 25 nM Vitamin D₃ über 24 Stunden zwar eine 12-fache Genexpression und die mit 25 nM Vitamin D₃ plus 10 µM U0126 eine 9 fache, jedoch besteht zwischen beiden Ergebnissen kein signifikanter Unterschied. Nach 8 bzw. 48 Stunden erkennt man auch geringe Unterschiede in der Expression des *camp*-Gens, sie sind aber ebenso nicht signifikant.

Auch in den Zelllinien SW 480, T 84 und GEKI 02 erzielt eine Inkubation mit Vitamin D₃ plus 10 µM U0126 keine signifikant geringere Expression des *camp*-Gens verglichen mit einer Behandlung mit Vitamin D₃. (Ergebnisse der Zelllinien T 84 und GEKI 02 sind nicht abgebildet.)

A



B

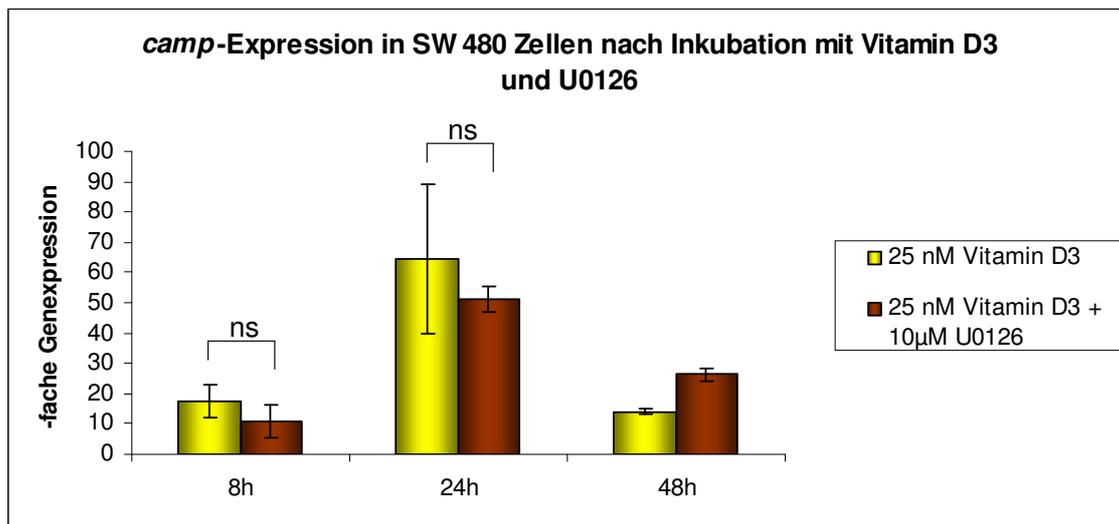


Abb. 19: A: *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃ und 10 μM U0126.

B: *camp*-Expression in SW 480 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃ und 10 μM U0126. Die Zellen der Linien HT 29 und SW 480 wurden mit und ohne 10 μM U0126 für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 25 nM Vitamin D₃ wurden die Zellen für weitere 8, 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD. (ns: nicht signifikant; Student's T-Test;)

3.6.2 Einfluss des MEK/ERK Signalweges bei der Induktion des *camp*-Gens durch Intestamin[®]

3.6.2.1 *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit Intestamin[®] und U0126

Der Signalweg MEK/ERK ist an der Induktion des *camp*-Gens durch Intestamin[®] beteiligt.

Werden HT 29 Zellen mit 10% Intestamin[®] plus U0126 behandelt, zeigt sich eine deutliche Verminderung der Genexpression verglichen mit einer Inkubation mit 10% Intestamin[®]. Nach 8 Stunden halbiert sich die Expression von *camp*, nach 24 Stunden beträgt sie ein Achtel und nach 48 Stunden sinkt die *camp*-Expression von einer 79-fachen auf eine 24-fache Genexpression.

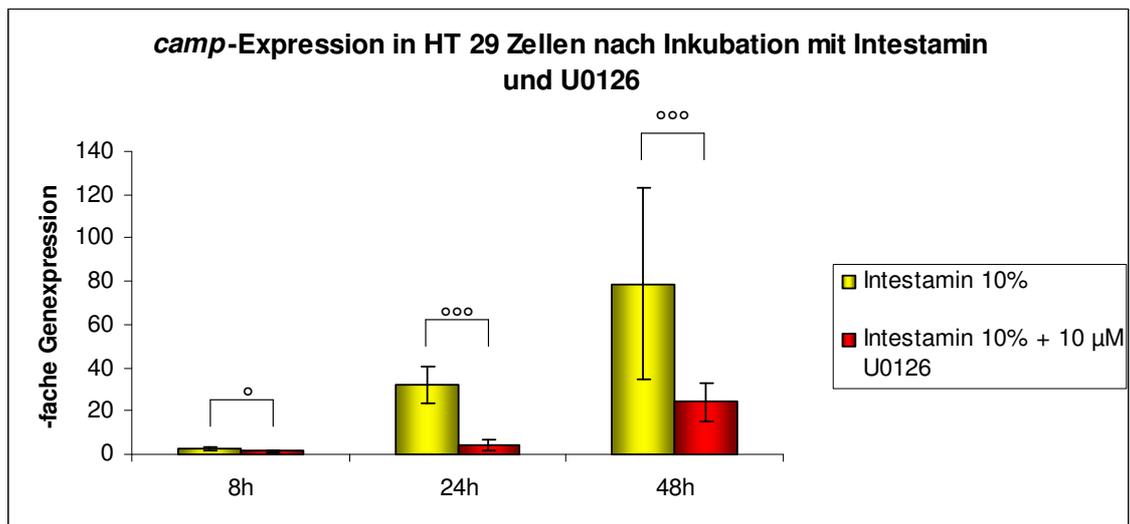


Abb. 20: *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®] und 10 μM U0126. HT 29 Zellen wurden mit und ohne 10 μM U0126 für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10% Intestamin[®] wurden die Zellen für weitere 8, 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD. (ns: nicht signifikant; °: p<0,05; °°°: p<0,001; Student's T-Test; in Bezug auf mit 10% Intestamin[®] behandelte Zellen).

3.6.2.2 *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit Intestamin[®] und U0126

Inkubiert man T 84 Zellen mit Intestamin[®] und dem spezifischen MEK 1 Inhibitor U0126, zeigt sich ebenso wie in HT 29 Zellen eine starke Hemmung der durch Intestamin[®] induzierten *camp*-Expression.

Nach 8 Stunden ist die Genexpression signifikant vermindert, nach 24 und 48 Stunden sieht man eine hochsignifikante Reduktion der *camp*-Expression verglichen mit Intestamin[®] behandelten Zellen.

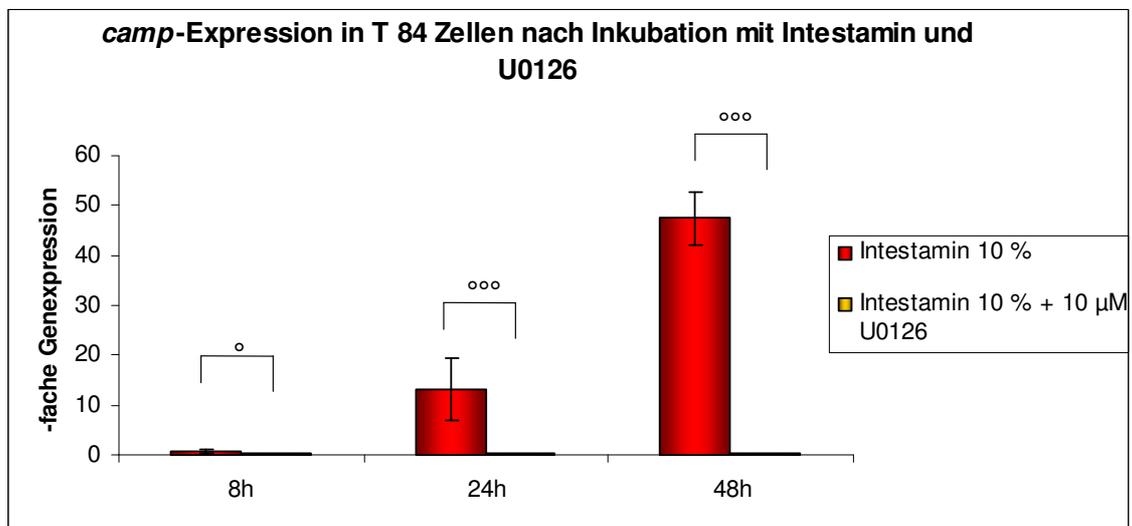


Abb. 21: *camp*-Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®] und 10 µM U0126. T 84 Zellen wurden mit und ohne 10 µM U0126 für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10% Intestamin[®] wurden die Zellen für weitere 8, 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD. (ns: nicht signifikant; °: p<0,05; °°: p<0,001; Student's T-Test; in Bezug auf mit 10% Intestamin[®] behandelte Zellen).

3.6.2.3 *camp*-Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit Intestamin[®] und U0126

In SW 620 Zellen lassen sich mit dem Inhibitor U0126 keine einheitlichen Ergebnisse erzielen. Nach 8 Stunden bewirkt eine Behandlung der Zellen mit 10% Intestamin[®] plus 10 μ M U0126 zwar gegenüber einer Behandlung mit Intestamin[®] eine signifikante Verminderung der Genexpression von 11 auf 3. Nach 24 Stunden zeigt sich keine signifikante Erniedrigung, nach 48 Stunden eine Erhöhung der Expression des *camp*-Gens.

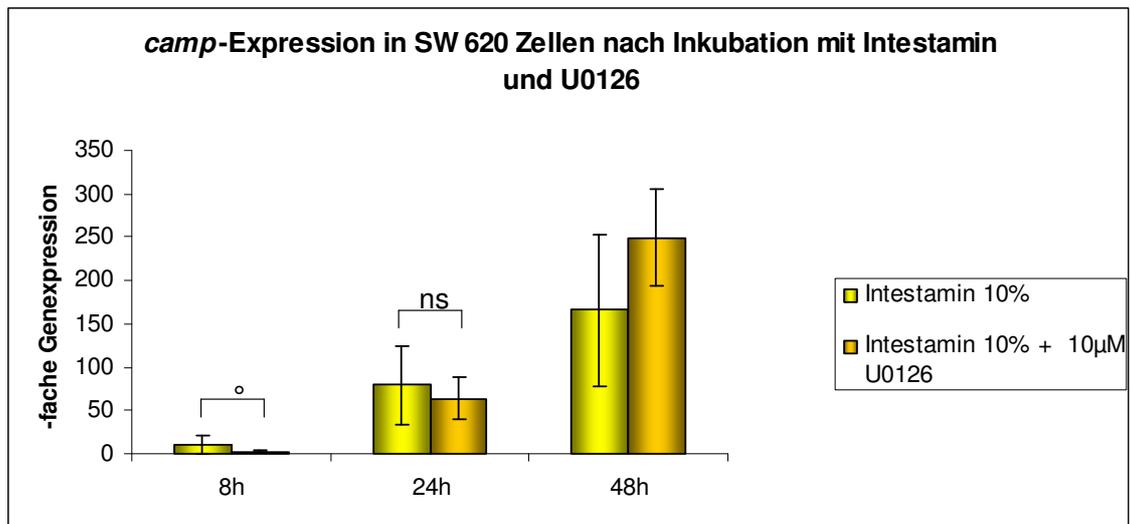


Abb. 22: *camp*-Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®] und 10 μ M U0126.

SW 620 Zellen wurden mit und ohne 10 μ M U0126 für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10% Intestamin[®] wurden die Zellen für weitere 8, 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD. (ns: nicht signifikant; °: $p < 0,05$; °°: $p < 0,001$; Student's T-Test; in Bezug auf mit 10% Intestamin[®] behandelte Zellen).

3.6.2.4 *camp*-Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit Intestamin[®] und U0126

Eine Inkubation von GEKI 02 Zellen mit Intestamin[®] plus U0126 hat nach 8 Stunden keinen hemmenden Effekt auf die Genexpression verglichen mit einer Behandlung der Zellen mit Intestamin[®]. Nach 24 Stunden zeigt sich eine hochsignifikante Verminderung der *camp*-Expression, während nach 48 Stunden eine Halbierung der Genexpression keine signifikante Reduktion darstellt.

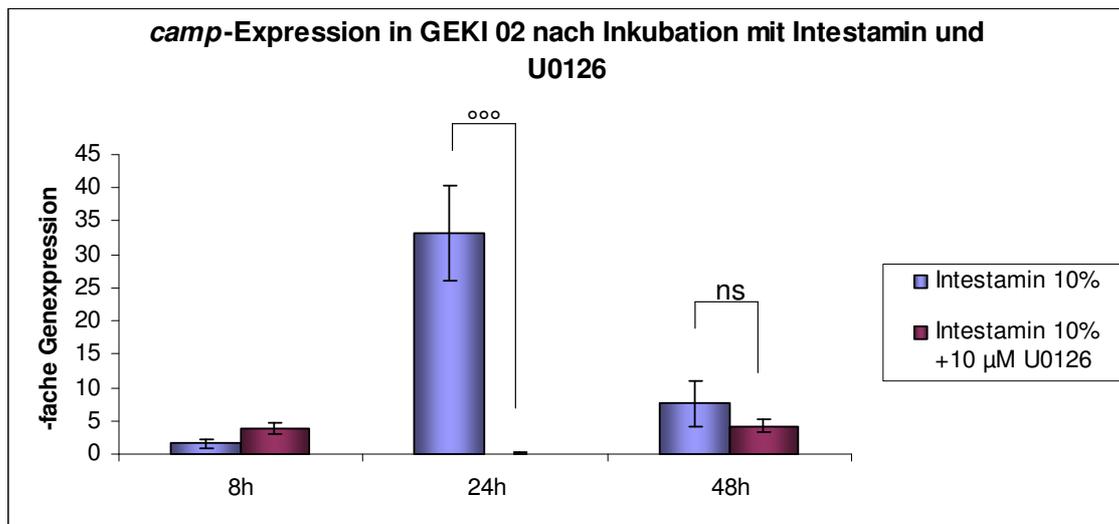


Abb. 23: *camp*-Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®] und 10 µM U0126.

GEKI 02 Zellen wurden mit und ohne 10 µM U0126 für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10% Intestamin[®] wurden die Zellen für weitere 8, 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD. (ns: nicht signifikant; °: p<0,05; °°: p<0,001; Student's T-Test; in Bezug auf mit 10% Intestamin[®] behandelte Zellen).

3.6.2.5 Beeinflussung der *camp*-Expression in Kolonepithelzellen durch U0126: ein Vergleich zwischen Intestamin[®] und Butyrat

J. Schauber konnte zeigen, dass der intrazelluläre Signalweg MEK/ERK an der Induktion des *camp*-Gens durch Butyrat beteiligt ist. In HT 29 Zellen wies er eine Inhibition der durch Butyrat induzierten *camp*-Expression durch U0126 nach¹⁰⁵.

Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden und sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

In HT 29 Zellen führt die Behandlung von 4 mM Butyrat plus 10 µM U0126 zu einer hochsignifikanten Reduktion der Genexpression von *camp* im Vergleich zu einer Behandlung mit Butyrat. Auch eine Behandlung mit 10% Intestamin[®] plus 10 µM U0126 bewirkt eine hochsignifikante Verminderung der Genexpression im Vergleich zu einer Behandlung mit Intestamin[®].

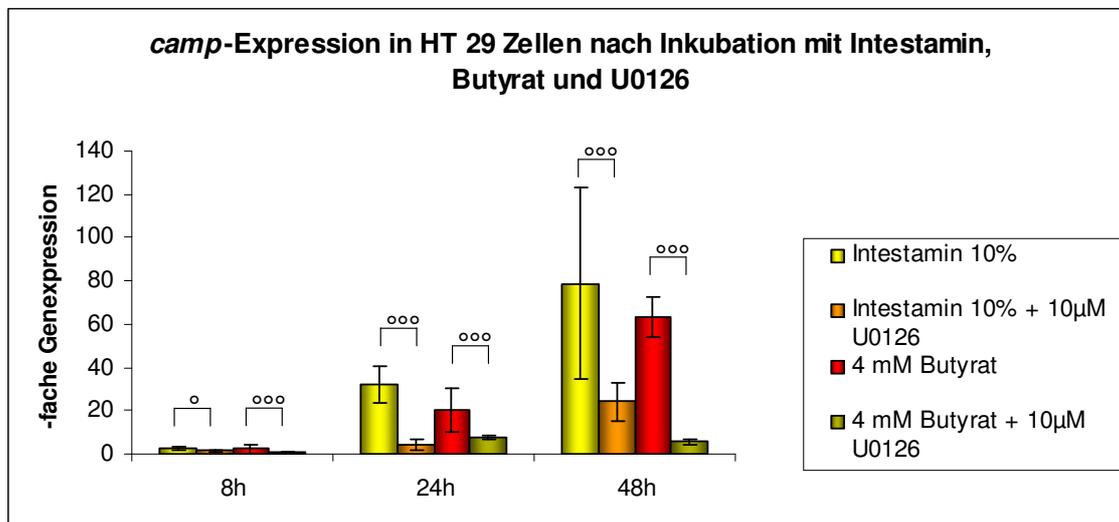
		Intestamin [®]	Intestamin [®] + U0126	Butyrat	Butyrat + U0126
HT 29 Zellen	8h	2,38	1,34 [■]	2,36	0,88 ^{□□□}
	24h	31,95	4,14 ^{■■■}	20,19	7,55 ^{□□□}
	48h	78,79	24,33 ^{■■■}	63,17	5,69 ^{□□□}
SW 620 Zellen	8h	11,14	3,16 [■]	6,98	6,34
	24h	79,18	63,97	200,06	180,15
	48h	165,91	249,81	364,87	817,64
GEKI 02 Zellen	8h	1,56	3,81	2,13	0,4 ^{□□□}
	24h	33,20	0,13 ^{■■■}	40,89	0,12 ^{□□□}
	48h	7,55	4,16	110,87	53,9 ^{□□□}

Tabelle 4: -fache *camp*-Expression in HT 29, SW 620 und GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®], 4 mM Butyrat und 10 µM U0126; Die Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mit und ohne 10 µM U0126 für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10% Intestamin[®] bzw. 4 mM Butyrat wurden die Zellen für weitere 8, 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD. . Signifikanzniveau p<0,01 und p<0,001. Student's T-Test; [■], ^{■■■}: in Bezug auf mit Intestamin[®] behandelte Zellen; [□], ^{□□□}: in Bezug auf mit Butyrat behandelte Zellen;

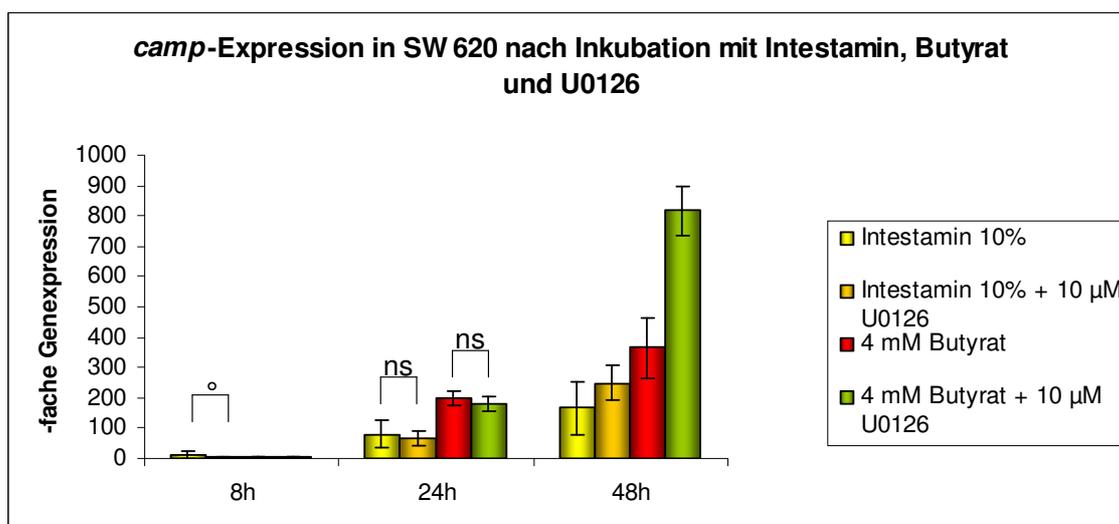
In SW 620 Zellen lassen sich sowohl bei einer Behandlung mit Butyrat plus U0126, als auch bei einer Behandlung mit Intestamin[®] plus U0126 keine Auswirkungen erzielen.

Inkubiert man GEKI 02 Zellen mit Butyrat plus U0126, erzielt man sowohl nach 24, als auch nach 48 Stunden eine hochsignifikante Verminderung der *camp*-Expression verglichen mit der Inkubation mit Butyrat. Die Co-Stimulation Intestamin[®] plus U0126 bewirkt zwar nach 24 Stunden ebenso eine hochsignifikante Reduktion der Genexpression, nach 48 Stunden kann diese jedoch nicht mehr nachgewiesen werden.

A



B



C

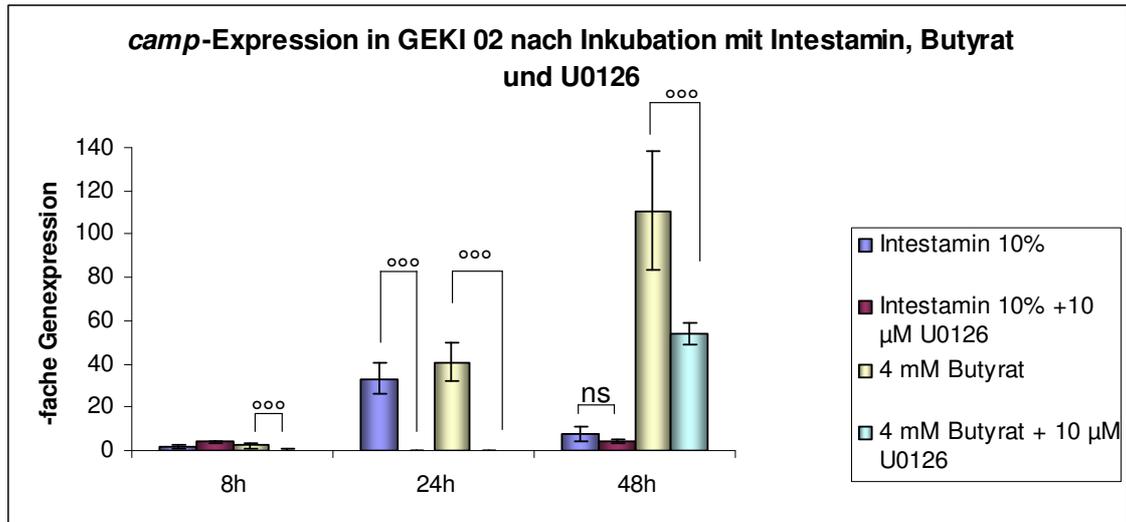


Abb. 24: A: *camp*-Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®], 4 mM Butyrat und 10 μM U0126; B: *camp*-Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®], 4 mM Butyrat und 10 μM U0126; C: *camp*-Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin[®], 4 mM Butyrat und 10 μM U0126. Die Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mit und ohne 10 μM U0126 für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10% Intestamin[®] bzw. 4 mM Butyrat wurden die Zellen für weitere 8, 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR für LL-37 und GAPDH. Die Genexpression ist in Relation zu mit Medium behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD. (ns: nicht signifikant; °: p<0,05; °°: p<0,001; Student's T-Test; in Bezug auf mit 10% Intestamin[®] behandelte Zellen).

3.7 Antimikrobielle Aktivität von HT 29 Zellen gegenüber *E.coli*

Um zu analysieren, ob eine durch 1,25(OH)₂D₃ und Butyrat induzierte Cathelicidin Genexpression eine verstärkte antimikrobielle Aktivität besitzt, wurde ein Überlebensassay durchgeführt. Beispielhaft wurde hierfür die Zelllinie HT 29 verwendet.

HT 29 Zellen zeigen unbehandelt eine antimikrobielle Aktivität gegenüber *E.coli*. Diese kann durch eine Inkubation der Zellen mit 4 mM Butyrat über 24 oder 48 Stunden nicht wesentlich verstärkt werden. Die Behandlung mit 25 nM Vitamin D₃ über 24 oder 48

Stunden erzielt ebenso keine Vergrößerung der Hemmhöfe im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die lysierten Bereiche der mit 25 nM Vitamin D₃ plus 4 mM Butyrat behandelten Zellen sind 1,3 mal so groß wie die der unbehandelten Zellen.

Obwohl Vitamin D₃ und Butyrat in HT 29 Zellen die Expression des Cathelicidin Gens *camp* induzieren, zeigen die behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine verstärkte antimikrobielle Aktivität gegenüber *E.coli*.

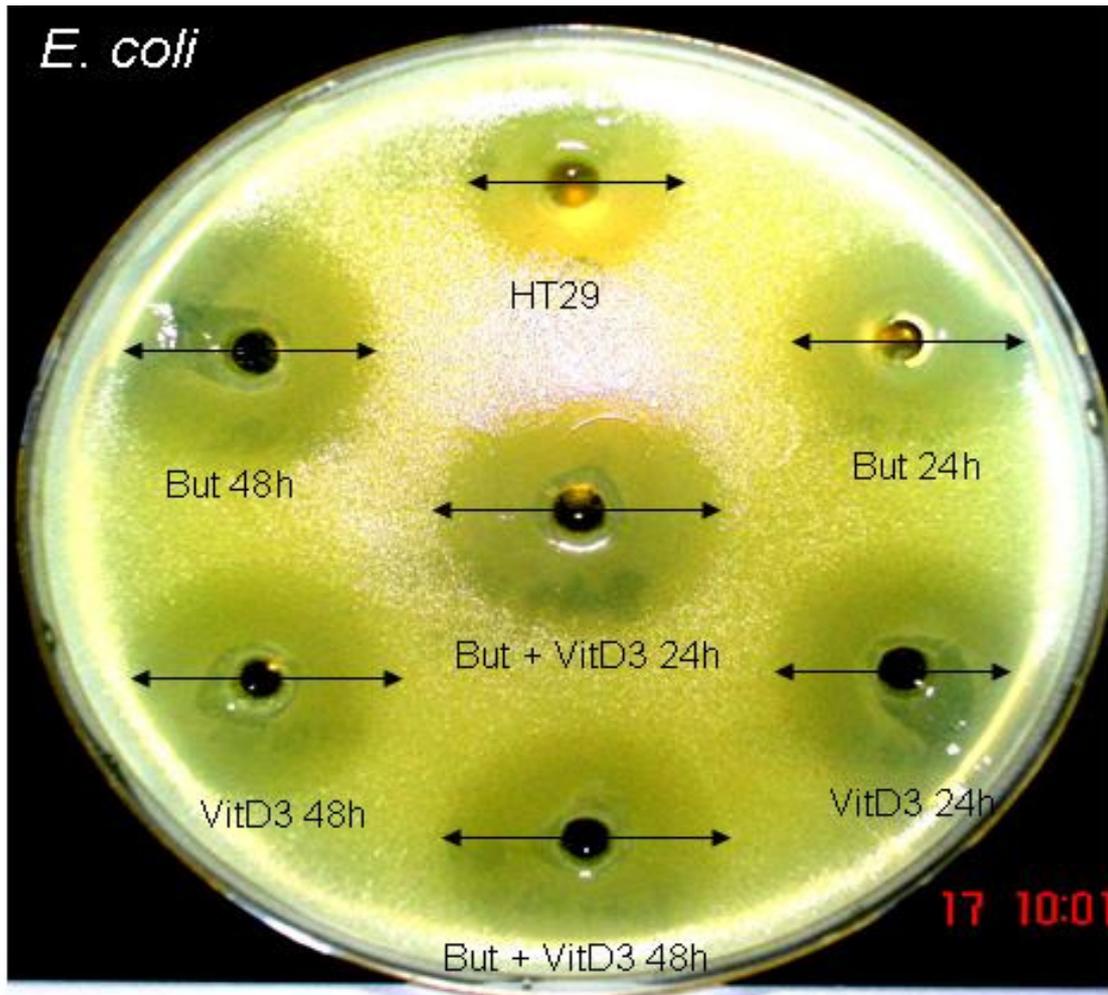


Abb. 25: Überlebensassay von *E.coli* gegenüber stimulierten HT 29 Zellen
 HT 29 Zellen wurden mit 25 nM Vitamin D₃ und 4 mM Butyrat über 24 und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden Zellysate hergestellt, indem HT 29 Zellen in PBS gelöst, durch Ultraschall lysiert und mittels einer Lyophilen ankonzentriert wurden. In LB-Agarplatten wurden Löcher gestanzt, in welche die Zellysate pipettiert wurden. *E.coli* in der log-Phase wurden mittels Weichagar darüber gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Durchmesser der transparenten, lysierten Bereiche spiegelt den Grad der antimikrobiellen Aktivität der HT 29 Zellen gegenüber *E.coli* wider.

4 Diskussion

Obwohl unser Körper in ständigem Kontakt mit zahlreichen Mikroorganismen steht, erkrankt der Mensch selten an Infektionskrankheiten. Die intakte Epithelzellschicht an den Schleimhautoberflächen von Lunge, Haut, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt bildet eine Barriere gegenüber Mikroorganismen. Ausgestattet mit Effektormolekülen, wie antimikrobiellen Peptiden, ist sie in der Lage unseren Körper vor dem Eindringen pathogener Keime zu bewahren^{1, 189}. Besonders der Gastrointestinaltrakt, der mit ca. 400 m² die größte Oberfläche des Menschen darstellt, befindet sich in stetiger Auseinandersetzung mit Mikroben. Besiedelt mit ca. 10¹⁴ Bakterien¹⁹⁰, muss der Darm über spezielle Abwehrmechanismen verfügen, um sich insbesondere gegen krankheitserregende Mikroorganismen zur Wehr setzen zu können. Die Produktion antimikrobieller Peptide (AMP) stellt eine Abwehrstrategie des angeborenen Immunsystems dar^{2, 3}. Beim Menschen sind neben anderen AMPs die Defensine und das einzig bekannte humane Cathelicidin LL-37 von Bedeutung für die Immunabwehr. α -Defensine werden unter anderem von den Paneth Zellen des Dünndarms, β -Defensine und das Cathelicidin von den Epithelzellen des Kolons exprimiert¹⁰. Cathelicidine zeigen nicht nur ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität gegenüber Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen¹⁹⁻²², sie sind auch beteiligt an einer Reihe von Erkrankungen der Haut⁶²⁻⁶⁶, der Lunge^{69,70} und des Gastrointestinaltrakts^{24,73-76}.

Das Wissen jedoch über die Faktoren, die die Synthese und Expression antimikrobieller Peptide, insbesondere des humanen Cathelicidins LL-37, beeinflussen, ist bisher noch lückenhaft. Ebenso ist wenig darüber bekannt, über welche Signalwege das Cathelicidin seine Wirkungen an die Zelle vermittelt.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Auswirkungen von Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃), Butyrat und Intestamin[®] auf die Expression des *camp*-Gens anhand von *in-vitro* Experimenten an Kolonepithelzellen. Weiterhin sollte die Beteiligung des intrazellulären Signalwegs MEK/ERK an der Signalübermittlung untersucht werden.

Sicherlich sind *in-vivo* Experimente für die Auswirkung von Substanzen auf den Darm aussagekräftiger als *in-vitro* Experimente, da sie die normale Physiologie und die komplexen Bedingungen im menschlichen Organismus berücksichtigen. Aber solche Experimente sind in der Praxis nur schwer durchführbar. Man müsste dazu die Epithelzellen einzeln aus der Mukosa auslösen oder sie als gesamte Mukosaschicht von der Muskelschicht trennen, um die Zellen untersuchen zu können¹⁹¹. Untersuchungen anhand von Zellkulturen dagegen sind in der Praxis weit verbreitet, da Zellkulturen wissenschaftlich etabliert, gut verfügbar und einfach in der Handhabung sind¹⁴⁰. Allerdings finden die Experimente in kontrollierter Umgebung außerhalb des menschlichen Organismus statt und bedürfen, um auf die Vorgänge in der Natur übertragen werden zu können, einer Überprüfung *in-vivo*.

Für die vorliegende Arbeit wurden vier verschiedene Zelllinien von kolorektalen Karzinomen (HT 29, T 84, SW 620, SW 480), eine Adenomzelllinie (GEKI 02) und eine Monozytenzelllinie verwendet (U 937). Diese Zelllinien werden von vielen Forschungsgruppen verwendet und sind für *in-vitro* Experimente zur Untersuchung und Klärung vielerlei gastrointestinaler Fragestellungen geeignet^{104, 192, 193}. Die Etablierung von Zelllinien aus ursprünglich neoplastischen, immortalisierten Zellen bietet die Möglichkeit, diese Zellen längerfristig zu kultivieren, um *in-vitro* Experimente an ihnen durchführen zu können^{177,191}. Da diese Zellen neoplastischen Ursprungs sind und chromosomale Aberrationen oder genetische Alterationen aufweisen, repräsentieren sie jedoch nicht die gesunden Kolonepithelzellen, sondern spiegeln späte Neoplasiestadien wider¹⁴⁰. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die kolorektale Adenomzelllinie GEKI 02 verwendet. GEKI 02 Zellen sind genetisch stabil und weisen wenige chromosomale Aberrationen auf, da es sich um ein frühes Stadium der Adenom-Karzinom-Sequenz handelt¹⁸⁶.

4.1 Einfluss von Vitamin D₃ auf die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen

Die Bedeutung des Vitamin D für die Regulierung des Knochenstoffwechsels und der Calcium- und Phosphatspiegel im Körper ist seit langem bekannt. In den letzten beiden Jahrzehnten erkannte man jedoch, dass Vitamin D eine weitaus größere Rolle im Körper spielt und neben dem Knochenstoffwechsel und der Calciumhomöostase auch die Zelldifferenzierung, das Zellwachstums, das Immunsystem und andere hormonell gesteuerte Systeme beeinflusst¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Ob die aktive Form des Vitamin D₃, das Calcitriol, auch die Expression des Cathelicidins LL-37 beeinflusst, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Die Inkubation der Kolonepithelzellen HT 29, SW 480, T 84 und GEKI 02 mit Vitamin D₃ bewirkt eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der Expression des *camp*-Gens.

Eine Dosisfindungsstudie wurde zunächst durchgeführt, um die Zellen mit jenen Konzentrationen an 1,25(OH)₂D₃ zu stimulieren, welche einen Effekt auf die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen ausüben. Zugleich konnten dadurch eventuell auftretende toxische Effekte des Vitamin D₃ auf die Zellen ermittelt werden.

Eine Stimulation von HT 29, SW 480 und GEKI 02 Zellen mit 1 nM, 7,5 nM und 10 nM Vitamin D₃ konnte im Allgemeinen keine gesteigerte Expression des Cathelicidin Gens bewirken. In T 84 Zellen jedoch führte eine Behandlung der Zellen mit 7,5 nM und 10 nM Vitamin D₃ bereits zu einer erhöhten Genexpression. Eine Behandlung mit 15 nM Vitamin D₃ vermochte in allen getesteten Zelllinien eine Steigerung der Expression des *camp*-Gens zu induzieren. Die deutlichste Zunahme der Genexpression wurde durch eine Behandlung mit 25 nM Vitamin D₃ über 24 Stunden erreicht. Die Inkubation der Zellen mit 25 nM Vitamin D₃ über 24 Stunden zeigte gegenüber einer Inkubation über 8 Stunden eine signifikante, bzw. hochsignifikante Steigerung der Cathelicidin Expression. Nach 48 Stunden kam es wieder zu einer Abnahme der Expression des *camp*-Gens. Eine Behandlung der getesteten Zellen mit 50 nM Vitamin D₃ konnte lediglich in GEKI 02 Zellen eine Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens hervorrufen. In den anderen getesteten Zelllinien war dies nicht der Fall. Diese Verringerung der *camp*-Expression nach Behandlung der Zellen mit 50 nM Vitamin D₃

lässt sich auf den gesteigerten Anteil an toten Zellen zurückführen, der bereits in der Zellkultur beobachtet werden konnte. Die toten Zellen wurden in der Kultur durch Absaugung eliminiert. Der photometrisch gemessene erniedrigte RNA-Gehalt der Zellen korrelierte mit der geringen Expression des Cathelicidin Gens. Aufgrund dieser Beobachtungen muss davon aufgegangen werden, dass eine Dosis von 50 nM Vitamin D₃ eine toxische Wirkung auf die Zellen besitzt.

Vitamin D₃ ist nach Gombart ein extrazellulärer Stimulus, der imstande ist, die *camp*-Expression in Keratinozyten, Monozyten und Kolonepithelzellen zu induzieren. Die biologisch aktive Form, das 1,25-(OH)₂D₃, ist in der Lage, die Expression des Cathelicidin Gens in U 937 und HT 29 Zellen zu steigern¹⁰⁷. Ebenso konnte Wang die Steigerung der Expression von *camp* in U 937 Zellen nachweisen. Die Inkubation von U 937 Zellen mit 10 nM Vitamin D₃ zeigte eine zeitabhängige Steigerung der Genexpression mit dem größten Effekt nach 24 Stunden¹⁹⁴.

Die Ergebnisse von Wang und Gombart konnten in unserem Labor bestätigt werden. Eine Behandlung von U 937 Zellen mit Vitamin D₃ zeigte eine zeit- und dosisabhängige Induktion der *camp*-Expression. Konzentrationen zwischen 1 nM bis 25 nM Vitamin D₃ bewirkten dabei eine Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens, bei einer Konzentration von 50 nM Vitamin D₃ war dies aufgrund der vermutlich toxischen Wirkung dieser Dosis nicht mehr der Fall.

Die Induktion der Cathelicidin-mRNA nach Vitamin D₃ Exposition wird auf die Existenz eines Vitamin D Response Element (VDRE) in der Promoterregion des *camp*-Gens zurückgeführt. In der Promoterregion des *camp*-Gens konnte ein funktionelles VDRE identifiziert werden, an das der Vitamin D-Rezeptor als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor bindet und die Genexpression vermittelt^{107, 194}. Dieses VDRE ist innerhalb eines short interspersed element (SINE) lokalisiert, das im Menschen und Schimpansen konserviert ist, nicht aber in Nicht-Primaten wie der Maus¹⁰⁷.

Auch in Zellen von Prostata-, Lungen- und Endometriumskarzinomen zieht eine Stimulation der Zellen mit 1,25(OH)₂D₃ eine Steigerung der Expression von *camp* nach

sich¹⁰⁷. Gleiches gilt für Keratinozyten¹⁰⁴. Schauber legte 2006 dar, dass Vitamin D₃ die Cathelicidin Expression in Keratinozyten und Monozyten induziert. Jedoch konnte eine Behandlung der kolorektalen Zelllinie HT 29 mit Vitamin D₃ keine gesteigerte Expression von *camp* bewirken, obwohl Vitamin D₃ in allen Zelltypen das VDRE in der Promoterregion des Cathelicidin-Gens aktivierte. HT 29 Zellen antworteten zwar auf die Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃ mit einer erhöhten Promoteraktivität und einer erhöhten Expression des CYP24A1, der 24-Hydroxylase, die dem Abbau des Calcitriol dient, jedoch wurde weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene das Cathelicidin induziert¹⁰⁴. Diese fehlende Induktion des *camp*-Gens in HT 29 Zellen nach Stimulation mit Vitamin D₃ steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu unseren Ergebnissen. Wir konnten zeigen, dass eine Inkubation von HT 29 Zellen die Expression des *camp*-Gens induziert. Allerdings ist die Induktion zeit- und dosisabhängig. Eine Steigerung der Genexpression erfolgte nach Stimulation der Zellen mit 15 und 25 nM Vitamin D₃ über 8, 24 und 48 Stunden, wobei eine Stimulation mit 25 nM Vitamin D₃ über 24 Stunden die größten Effekte erzielte. Eine Behandlung der HT 29 Zellen mit 50 nM Vitamin D₃ führte zu einem plötzlichen Abfall der *camp*-Expression. Schauber verwendete für seine Versuche Konzentrationen von bis zu 200 nM Vitamin D₃¹⁰⁴. Berücksichtigt man die Dosisabhängigkeit der Steigerung des Cathelicidin Gens stimmen Schaubers Ergebnisse mit unseren überein, da wir eine gesteigerte Genexpression nur für Konzentrationen von 15 und 25 nM 1,25(OH)₂D₃ nachweisen konnten. Die Verringerung der *camp*-Expression nach einer Behandlung der Zellen mit 50 nM Vitamin D₃ weist auf einen zytotoxischen Effekt des Vitamin D₃ in dieser Dosis hin, der durch den gesteigerten Anteil an toten Zellen in der Zellkultur und einen photometrisch gemessenen erniedrigten RNA-Gehalt der Zellen bekräftigt wird.

Eine Dosisabhängigkeit kann in HT 29 Zellen auch für das Zellwachstum gezeigt werden^{195, 196}. Die Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen an Vitamin D₃, von 10⁻¹² bis 10⁻⁶ M, führt zu einer zunehmenden Hemmung des Zellwachstums und einer Reduktion des DNA-Gehalts der Zellen. Vitamin D₃ hemmt dosisabhängig nicht nur das Zellwachstum, es induziert auch Apoptose in HT 29 Zellen^{197, 198}. Nach der Behandlung mit 10⁻⁶ M Vitamin D₃ über 24 Stunden zeigten die nach Papanicolaou angefärbten HT 29 Zellen unter dem Mikroskop die typischen Anzeichen von Apoptose, wie Chromatinkondensation, Margination und Fragmentierung des Nukleus und die

Bildung von apoptotischen Körperchen. Andere Autoren gehen bei höheren Dosen Vitamin D₃ (zwischen 10⁻⁷ und 10⁻⁶M) aufgrund morphologischer Zellveränderungen auch von einem zytotoxischen Effekt des Vitamin D₃ aus¹⁹⁵.

Die Hemmung des Zellwachstums, die Reduktion des DNA Gehalts und die Induktion der Apoptose in HT 29 Zellen könnten mögliche Erklärungen für die fehlende Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens nach Behandlung mit Vitamin D₃ in Größenordnungen von 100 - 200 nM (= 10⁻⁷ M) darstellen¹⁰⁴. Über die Gründe, warum HT 29 Zellen auf die Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃ mit einer erhöhten Promoteraktivität des VDRE reagierten, ohne dass das Cathelicidin auf mRNA-Ebene oder auf Proteinebene induziert wurde¹⁰⁴, kann jedoch nur spekuliert werden.

Die Auswirkungen von Vitamin D₃ auf das Cathelicidin LL-37 wurden bisher in *in-vitro* Versuchen nachgewiesen. Weber konnte zeigen, dass die topische Applikation von 10-100 nM Vitamin D₃ die Expression des *camp*-Gens in Hautzellen *in-vivo* induziert. Dies bestätigte er zudem auf Proteinebene, indem er die Hochregulierung des hCAP18 durch Western Blots nachwies. *In-vivo* war die aktive Form des Vitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃, fähig, eine Steigerung der Genexpression auszulösen. Das 7 Dehydrocholesterol, eine Vorstufe aus der Vitamin D₃ Biosynthese, war dazu nicht in der Lage¹⁹⁹.

Über Toll-like-Rezeptoren (Toll-like receptors, TLRs) stellt Vitamin D₃ die Verbindung zwischen der Erkennung von Mikroben und der Aktivierung des angeborenen Immunsystems her. Toll-like-Rezeptoren gehören zur Gruppe der Pattern Recognition Receptors (PPRs) und dienen der Erkennung von Pathogen assoziierten Strukturen (Pathogen associated molecular pattern, PAMPs). Diese Strukturen kommen auf Krankheitserregern, wie Viren, Bakterien oder Pilzen, vor und führen über die Signalwege der TLRs zur Aktivierung des Immunsystems²⁰⁰⁻²⁰².

In tracheobronchialen Epithelzellen sind TLRs in der Lage, direkt die Expression des humanen β-Defensins HBD-2 zu induzieren²⁰³. Für Cathelicidine konnte diese direkte Beziehung bisher nicht gezeigt werden. Jedoch hat die Aktivierung des TLR 2 in Makrophagen die Induktion des Vitamin D-Rezeptors und die des Enzyms 1α-Hydroxylase, welches die Umwandlung von 25(OH)₂D₃ in das biologisch aktive

1,25(OH)₂D₃ katalysiert, zur Folge und führt dadurch zur Induktion des Cathelicidins²⁰⁴. In seinen Experimenten zeigten Liu und Kollegen anhand von *M. tuberculosis*, dass die Gabe von 1,25(OH)₂D₃ die Anzahl der lebensfähigen Mykobakterien in menschlichen Makrophagen reduziert. Eine Blockade des Enzyms CYP27B1, der 1 α -Hydroxylase, oder die Antagonisierung des VDR verringerten diesen antimikrobiellen Effekt um 70%. Die endogene Produktion des 1,25(OH)₂D₃ und nachfolgende Aktivierung des VDR sind also für den antimikrobiellen Effekt, der durch die TLRs vermittelt und durch das Cathelicidin ausgeübt wird, notwendig²⁰⁴.

Ein interessanter Aspekt ist, dass der TLR 2, der die Expression des Vitamin D-Rezeptors und des Enzyms CYP27B1 stimuliert, selbst durch 1,25(OH)₂D₃ induziert werden kann. In kultivierten Keratinozyten wird die Expression der Oberflächenmoleküle TLR 2 und CD 14, einem TLR 2-Korezeptor, durch eine Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ begünstigt²⁰⁵. Dies konnte *in-vivo* bestätigt werden. Die topische Applikation von 1,25(OH)₂D₃ führte zur Induktion des TLR 2 und nachfolgend des Cathelicidin-Gens. Neben der Applikation von Vitamin D₃ führt auch eine Verletzung der Haut zu einer Zunahme der Genexpression für CD 14 und TLR 2²⁰⁵.

Die Induktion der TLR 2 Expression durch 1,25(OH)₂D₃, welche für Keratinozyten nachgewiesen werden konnte, ist wahrscheinlich zelltyp-spezifisch. In Monozyten nämlich induziert 1,25(OH)₂D₃ zwar die Expression des CD 14 Proteins, die Expression von TLR 2 verringert es aber²⁰⁶. Dadurch beeinflusst es die Antwort des Immunsystems auf bakterielle Strukturen und ruft eine weniger starke Entzündungsreaktion hervor im Sinne einer immunmodulatorischen Wirkung des Vitamin D₃ auf Monozyten^{111, 207}. In Keratinozyten dagegen dient die Induktion der beiden Oberflächenmoleküle TLR 2 und CD 14 durch 1,25(OH)₂D₃ der Erkennung mikrobieller Strukturen und unter Beteiligung des Cathelicidins der Abwehr einer Reihe von Erregern, die für Wundinfektionen relevant sind²⁰⁸.

4.2 Einfluss von Butyrat auf die *camp*-Expression

Die Expression von Genen unterliegt komplexen Regulierungsmechanismen. Generell kann die Genexpression auf DNA-, Transkriptions- und Translationsebene beeinflusst werden. Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription spielt der Zugang der Transkriptionsfaktoren zur DNA, der durch die Auflockerung der Chromatinstruktur erleichtert wird. Eine Voraussetzung hierfür ist die Acetylierung von Histonen. Sie bewirkt, dass der positiv geladenen Lysinrest am N-terminalen Ende der Histone neutralisiert und dadurch die Affinität der Histone zur negativ geladenen DNA verringert wird^{153, 209}. Die Acetylierung von Histonen erfolgt entweder durch die Aktivierung der Histonacetyltransferase (HAT) oder die Inhibition der Histondeacetylase (HDAC)¹⁵⁴. Einen Inhibitor der Histondeacetylase (HDAC) stellt die kurzkettige Fettsäure Butyrat dar^{155, 156}. Durch eine nicht-kompetitive, reversible Hemmung der Histondeacetylase bewirkt Butyrat die Hyperacetylierung bestimmter Kernhistone und greift in die Regulation der Gentranskription ein¹⁵⁶.

Auch auf das *camp* Gen entfaltet Butyrat seine Wirkung. Es stellt einen Stimulus für die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 dar. Dies konnte *in-vitro* für Kolon epithelzellen, Magen-, Leberzellen und eine Lungenkarzinomzelllinie gezeigt werden^{53, 103, 105, 210}. Neben Butyrat führen auch Isobutytrat, Propionat und Trichostatin A zu einer gesteigerten Expression des Cathelicidin Gens, wobei Butyrat stärker als Trichostatin A oder die beiden anderen kurzkettigen Fettsäuren die *camp*-Expression induziert^{103, 105}.

Schaubers Ergebnisse, die die Induktion der *camp*-Expression durch Butyrat zeigen^{103, 105}, konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Da in Schaubers Experimenten, wie auch in unseren Vorversuchen, die Konzentration von 4 mM Butyrat den stärksten Effekt auf die Induktion des Cathelicidin Gens besaß¹⁰³, wählten wir diese Konzentration für unsere Versuche.

Die Zellen der Zelllinien GEKI 02, HT 29, T 84, SW 620 und SW 480 wurden über 8, 24 und 48 Stunden mit einer Dosis von 4 mM Butyrat inkubiert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte mittels Real-time PCR. Durch die Stimulation mit Butyrat konnte in allen Zelllinien eine zeitabhängige Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens erreicht werden. Eine Behandlung der Zellen mit 4 mM Butyrat über

48 Stunden bewirkte im Vergleich zu 8 bzw. 24 Stunden die größte Zunahme der Genexpression.

Da die kurzkettige Fettsäure zeit- und dosisabhängig die vermehrte Acetylierung der Histon Proteine H3 und H4 und des Nicht-Histon Proteins HMG-N2 bewirkt^{152, 156, 211} und diese Modifikation des Acetylierungsstatus mit der Induktion der LL-37 Expression korrespondiert, können die Auswirkungen von Butyrat auf die Genexpression des LL-37 auf die Modulation der Histonproteine zurückgeführt werden⁹⁹. Diese Effekte von Butyrat auf die Cathelicidin Expression scheinen allerdings zelltypspezifisch und vom umgebenden Milieu der Zelle abhängig zu sein¹⁰⁴. Butyrat, das im Kolon eine wichtige Rolle spielt und vielfältige Funktionen ausübt, ist ein Stimulus für die *camp*-Expression in Kolonepithelzellen, während es die LL-37 Expression in Keratinozyten, für die Butyrat physiologisch nicht von Bedeutung ist, nicht induziert¹⁰⁴.

Neben Butyrat vermögen auch andere Inhibitoren der Histondeacetylase die Expression antimikrobieller Peptide zu steigern. Sulforaphan, ein Histondeacetylase-Hemmer, der in hohen Konzentrationen in bestimmten Gemüsesorten, wie zum Beispiel Broccoli, vorkommt²¹², verstärkt dosisabhängig die Expression des antimikrobiellen Peptids HBD-2, des Humanen β -Defensin-2, in HT 29, SW 480 und Caco 2 Zellen. An der erhöhten Expression des HBD-2 sind dabei sowohl der VDR, als auch die Signalwege MEK/ERK und NF- κ B beteiligt²¹³.

4.3 Einfluss der Co-Stimulation mit Vitamin D₃ plus

Butyrat auf die *camp*-Expression

Die Substanzen 1,25(OH)₂D₃ und Butyrat sind beide in der Lage, die Expression des Cathelicidin Gens in Kolonepithelzellen zu steigern. Die Untersuchung, ob beide Substanzen bezüglich der *camp*-Expression synergetisch wirken und eine Co-Stimulation der Zellen mit beiden Substanzen, nämlich Vitamin D₃ plus Butyrat, eine zusätzliche Steigerung der *camp*-Expression erreichen kann, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit.

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zeigten, dass eine Dosis von 25 nM Vitamin D_3 in den getesteten Kolonepithelzellen - verglichen mit den Dosen 1 nM, 7,5 nM, 10 nM, 15 nM und 50 nM - die stärkste Zunahme der *camp*-Expression hervorruft. Aus diesem Grund wurden für die Koinkubationsversuche die Konzentrationen von 25 nM Vitamin D_3 und 4 mM Butyrat gewählt und die Zellen über 8, 24 und 48 Stunden inkubiert. Die Auswertung der exprimierten mRNA erfolgte analog zu den Erläuterungen im Teil Material und Methoden.

In der Adenomzelllinie GEKI 02 erzielte die Co-Stimulation der Zellen mit 25 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ plus 4 mM Butyrat nach 48 Stunden eine weitere Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens gegenüber beiden Einzelsubstanzen. Die synergetische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Butyrat auf die *camp*-Expression konnte jedoch nur nach 48 Stunden nachgewiesen werden. Eine Koinkubation der Zellen über 24 Stunden bewirkte zwar eine Erhöhung der Expression des Cathelicidin Gens gegenüber einer Behandlung mit der Einzelsubstanz Vitamin D_3 , nicht jedoch gegenüber einer Behandlung mit Butyrat.

In den Zellen der kolorektalen Karzinomzelllinien HT 29, T 84 und SW 480, ließ sich eine synergetische Wirkung der beiden Substanzen nicht nachweisen. Die Koinkubation mit Vitamin D_3 und Butyrat erzielte in keiner der drei genannten Zelllinien eine Zunahme der *camp*-Expression gegenüber einer Behandlung mit den Einzelsubstanzen.

Die Gründe, warum eine Koinkubation mit Vitamin D_3 plus Butyrat in GEKI 02 Zellen einen synergetischen Effekt auf die Expression des Cathelicidin Gens besitzt, in den übrigen getesteten kolorektalen Karzinomzelllinien HT 29, T 84 und SW 480 jedoch nicht, bleiben unklar. Die Kinetik der Induktion der *camp*-Expression durch beide Substanzen könnte eine Rolle spielen. Die Stimulationsversuche mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zeigten eine zeit- und dosisabhängige Induktion der LL-37 Expression. Dabei ließ sich ein vorübergehender Effekt erkennen. Eine Behandlung der Zellen über 24 Stunden erzielte eine stärkere Zunahme der *camp*-Expression als eine Behandlung über 8 Stunden. Nach 48 Stunden jedoch nahm die Genexpression wieder ab. Die Stimulationsversuche mit Butyrat zeigten ebenso eine zeitabhängige Komponente. Die Genexpression nahm mit der Zeit stetig zu und erzielte nach 48 Stunden die deutlichste Steigerung der *camp*-Expression. Die Tatsache, dass die Induktion der *camp*-Expression zeitabhängig ist, und somit die deutlichsten Auswirkungen auf die Genexpression des

LL-37 24 Stunden nach einer Stimulation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bzw. 48 Stunden nach einer Stimulation mit Butyrat auftreten, kann als eine Ursache für die fehlende zusätzliche Steigerung der *camp*-Expression gegenüber einer Behandlung mit den Einzelsubstanzen und damit fehlenden synergetischen Wirkung angeführt werden. Ob durch veränderte Inkubationszeiten eine zusätzliche Steigerung der *camp*-Expression nach der Co-Stimulation der Zellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ plus Butyrat und damit eine synergetische Wirkung beider Einzelsubstanzen erreicht wird, könnten weiterführende Versuche, die mit Inkubationszeiten von 32 oder 40 Stunden die Kinetik der Genexpression fortführend untersuchen, klären.

Zudem muss man in Betracht ziehen, dass die kolorektalen Karzinomzellen, für die sich keine synergetischen Effekte nach einer Co-Stimulation mit Vitamin D_3 plus Butyrat zeigen ließen, im Gegensatz zu den Adenomzellen GEKI 02 maligne Zellen neoplastischen Ursprungs sind, die chromosomale Aberrationen und genetische Alterationen aufweisen und somit nicht normale Kolonepithelzellen repräsentieren können^{140, 186}.

Weiterhin ist bisher noch nicht vollständig geklärt, ob der VDR an der Induktion der Expression des LL-37 durch Butyrat beteiligt ist. In Versuchen mit VDRE Konstrukten zeigt sich, dass Butyrat nicht in der Lage ist, die Promoteraktivität in HT 29 Zellen anzuregen. Butyrat steigert demnach die Cathelicidin Expression ohne das VDRE in der Promoterregion des *camp* Gens zu aktivieren¹⁰⁴.

Die Effekte, die Vitamin D_3 auf die Expression des Cathelicidin Gens ausübt, werden über den Vitamin D-Rezeptor vermittelt¹⁹⁴. Die Bindung des aktiven Vitamin D_3 an den VDR bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zu einer Heterodimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) (Retinsäurerezeptor) führt. Der entstandene VDR-RXR Komplex ist nun in der Lage, an das Vitamin D Response Element (VDRE) in den Promotorregionen der entsprechenden Gene zu binden und die Genexpression zu beeinflussen¹²⁰. Für die Transkription werden zusätzlich verschiedene Koaktivatoren benötigt. Der VDR bindet an Koaktivatoren-Komplexe wie beispielsweise den Steroid-Rezeptor-Koaktivator (steroid receptor coactivator, SRC)²¹⁴. SRCs wiederum rekrutieren HATs, welche durch die Acetylierung der Histone die

Chromatinstruktur auflockern²¹⁵ und dadurch Transkriptionsfaktoren den Zugang zur DNA erleichtern.

Dieser Mechanismus könnte bei der Induktion von *camp* eine Rolle spielen. Inkubiert man Keratinozyten mit Butyrat, so zeigt sich, dass Butyrat in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Expression des *camp*-Gens hat. Eine Koinkubation von Vitamin D₃ plus Butyrat allerdings verstärkt die *camp*-Expression gegenüber einer Behandlung mit der Einzelsubstanz Vitamin D₃. Die Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens wird durch die Blockierung des Koaktivators SRC 3 oder des VDRs unterdrückt²¹⁶. Die Induktion der Expression des Cathelicidin Gens durch 1,25(OH)₂D₃ kann also durch eine vermehrte Histonacetylierung gesteigert werden, die Induktion der Genexpression selbst aber wird durch den VDR vermittelt und ist vom Kofaktor SRC 3 abhängig. Der Koaktivator SRC 3 bewirkt die Öffnung der Chromatinstruktur über die Aktivierung der HAT, was für die durch den VDR vermittelte Transkription die Grundlage bildet und durch HDAC-Inhibitoren verbessert werden kann²¹⁶.

Eine synergetische Wirkung von Vitamin D₃ und dem Histondeacetylase-Inhibitor Butyrat konnte für die monozytäre Zelllinie U 937 gezeigt werden. Eine Stimulation der U 937 Zellen mit 1 nM Vitamin D₃ plus 1 mM Butyrat steigert die Genexpression um 30% gegenüber einer Inkubation mit der Einzelsubstanz Vitamin D₃ und um ein Vielfaches gegenüber einer Inkubation mit Butyrat alleine²¹⁷.

Einige Forschungsgruppen konnten eine Steigerung der *camp*-Expression durch 1,25(OH)₂D₃ in Kombination mit einer weiteren Substanz zeigen. Die kurzkettige Fettsäure Butyrat vermag als Inhibitor der Histondeacetylase die vermehrte Acetylierung der Histon Proteine H3 und H4 und des Nicht-Histon Proteins HMG-N2 herbei zu führen^{152, 156, 211}. Auch die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren TLR 2/6 und TLR 2/1 bewirkt eine vermehrte Histonacetylierung²¹⁶. TLRs sind für die Erkennung mikrobieller Strukturen und Oberflächenmoleküle von Bedeutung. Die Aktivierung der TLRs führt in Keratinozyten zur Produktion von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden und damit zur Antwort des angeborenen Immunsystems²¹⁸. Für den antimikrobiellen Effekt, der durch TLRs vermittelt und durch das Cathelicidin ausgeübt

wird, sind die endogene Produktion des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und die nachfolgende Aktivierung des VDR notwendig²⁰⁴. In Keratinozyten führt der selektive TLR 2/6 Ligand Malp-2 in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zur Induktion der *camp*-Expression²¹⁶. Auch die Behandlung der Zellen mit dem Immunsuppressivum Pimecrolimus, einem Calcineurin-Inhibitor, in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ steigert die Cathelicidin Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Eine weitere Zunahme der *camp*-Expression kann durch eine Behandlung mit allen drei Substanzen, nämlich Pimecrolimus plus Malp-2 plus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erreicht werden²¹⁸. Wieso es durch eine Co-Stimulation mit allen drei Substanzen zu einem weiteren Anstieg der *camp*-Expression kommt und welche Rolle das Pimecrolimus spielt, bleibt offen. Pimecrolimus könnte Gene modifizieren, die über Vitamin D_3 reguliert werden, an den gleichen Signalwegen wie Vitamin D_3 ansetzen oder andere Transkriptionsfaktoren, wie NF-AT (nuclear factor of activated T cells) oder NF- κB (Nukleärer Faktor κB) modulieren bzw. inhibieren²¹⁸. Für letzteres spricht, dass in der Promoterregion des Cathelicidin Gens der Maus CRAMP eine Bindungsstelle für NF- κB gefunden worden ist²¹⁹.

Die Expression antimikrobieller Peptide wird über die Signalwirkung der TLRs auch durch Lipopolysaccharide (LPS) induziert^{194, 202}. Das LPS selbst vermag keine Steigerung der *camp*-Expression zu erzielen. Eine kombinierte Behandlung LPS plus Vitamin D_3 aber ruft in menschlichen Neutrophilen eine stärkere Zunahme der Expression des Cathelicidin Gens hervor als die Einzelsubstanz Vitamin D_3 ¹⁹⁴. Wieso LPS als Einzelsubstanz nicht in der Lage ist, eine Steigerung der *camp*-Expression zu bewirken, in Kombination mit Vitamin D_3 aber schon, ist bislang nicht geklärt.

Das gleiche Phänomen konnte auch für TGF- β 1 gezeigt werden. TGF- β 1 zählt zu den Zytokinen, beeinflusst als Signalmolekül Zellproliferation und Zelldifferenzierung und besitzt immunmodulatorische Effekte. Es kommt im Wundsekret der Haut vor und ist in die Wundheilung involviert²²⁰. TGF- β 1 an sich führt keine Erhöhung der *camp*-Expression herbei. Jedoch ist es in der Lage das Enzym CYP27B1 zu induzieren, welches bei einer Inkubation von Keratinozyten mit der Vorstufe des Calcitriol, nämlich mit $25(\text{OH})\text{D}_3$, dieses in die aktive Form $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ überführen und dadurch das Cathelicidin induzieren kann²⁰⁵.

4.4 Einfluss von Intestamin[®] auf die *camp*-Expression

Die Barrierefunktion der Mukosa, die aus einer einzelligen Epithelzellschicht besteht und durch Effektormoleküle wie Cathelicidine unterstützt wird, ist essentiell für die Abwehr potentiell pathogener Keime im Darm. Bei schwerkranken Patienten ist die Aufrechterhaltung der Funktion und der Integrität des Darmes wichtig. Ihre Erhaltung und die Beeinflussung des mukosalen Immunsystems werden durch die Pharmakonutrition angestrebt.

Das enterale Ernährungssupplement Intestamin[®], das als Pharmakonutrition speziell für schwerkranke Patienten entwickelt wurde, ist reich an Glutamin-Dipeptiden, Tributyrin und Antioxidantien, wie Zink, Selen, Vitamin C, E und β -Carotin. Neben der Versorgung der Epithelzellen mit Energie und Nährstoffen, soll durch die Substanzen die Aufrechterhaltung der intestinalen Integrität und der Schutz vor oxidativem Stress gewährleistet werden. Die Einzelsubstanzen, aus denen Intestamin[®] besteht, waren bereits Thema einiger *in-vitro* und *in-vivo* Studien. Welche Auswirkungen aber ihre Kombination in Form des Präparats Intestamin[®] auf den menschlichen Organismus, insbesondere auf das lokale Immunsystem des Darms, hat, war bislang noch nicht Gegenstand der Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Intestamin[®] auf die Expression des Cathelicidins in Kolonepithelzellen untersucht. Die Versuche wurden *in-vitro* mit den kolorektalen Karzinomzelllinien HT 29, SW 620, T84 und der Adenomzelllinie GEKI 02 durchgeführt.

Eine Stimulation der Zellen mit Intestamin[®] rief zeit- und dosisabhängig eine Steigerung der Genexpression des Cathelicidins LL-37 hervor. In HT 29 Zellen bewirkte eine Behandlung mit 1,25%, 2,5% und 5% Intestamin[®] die Zunahme der Expression des *camp*-Gens. In den Zelllinien SW 620 und T 84 konnte eine Steigerung der Genexpression ab einer Konzentration von 2,5% und in GEKI 02 Zellen ab einer Konzentration von 5% Intestamin[®] erreicht werden. Eine Behandlung mit 10% Intestamin[®] resultierte in allen untersuchten Zelllinien in einer erhöhten Expression des Cathelicidin-Gens. In HT 29, SW 620 und T 84 Zellen führte die Inkubation mit 10% Intestamin[®] im Verlauf von 48 Stunden zu einer stetigen Zunahme der Genexpression. In GEKI 02 Zellen zeigte sich zeitlich eine unterschiedliche Entwicklung. Die stärkste

Induktion der *camp*-Expression wurde durch eine Inkubation über 24 Stunden hervorgerufen, nach 48 stündiger Inkubation kam es zu einer Abnahme der Genexpression.

Intestamin[®] setzt sich aus Tributyrin, Glutamin und Antioxidantien, wie Zink, Selen, Vitamin C, E und β -Carotin zusammen. Tributyrin, ein Inhaltsstoff des Intestamin[®], ist der Ester aus Glycerin und Butyrat^{174, 221}. Es wird in der klinischen Anwendung gut vertragen^{174, 221, 222}, da es eine inerte Verbindung darstellt, die keine Gewebe-Irritationen hervorruft und nicht toxisch ist. Natürliche Quellen für Tributyrin sind nicht bekannt²²³. Tributyrin wird chemisch als 1,2,3-O-Butanoylglycerol bezeichnet, da die Hydroxylgruppen des Glycerols mit 3 Molekülen n-Butyrat verestert sind. Die Butyrat Moleküle werden nach Hydrolyse durch ubiquitäre Lipasen freigesetzt²²⁴. Dabei entstehen aus einem Mol Tributyrin drei Mol Butyrat²²³. Die gewählten Konzentrationen von 1,25% bis 10% Intestamin[®] enthalten rechnerisch zwischen 0,4 und 3 mM Butyrat. Diese Dosen sind für eine Wirkung des Butyrats auf zellulärer Ebene ausreichend. Der Effekt, den Intestamin[®] auf die Induktion der Expression des Cathelicidin Gens ausübt, ist wahrscheinlich auf Tributyrin zurückzuführen. Tributyrin wird durch Hydrolyse zu Butyrat umgesetzt und bewirkt vermutlich die Steigerung der *camp*-Expression. Dies wird durch das analoge Verhalten der beiden Substanzen Butyrat und Intestamin[®] bekräftigt. Behandelt man die Zellen der Zelllinien HT 29, SW 480, SW 620, T 84 und GEKI 02 mit 4 mM Butyrat, zeigt sich eine stetige Zunahme der *camp*-Expression im Verlauf der 48 Stunden. Ebenso führt die Kultivierung von HT 29, SW 620 und T 84 Zellen mit 10% Intestamin[®] im Verlauf von 48 Stunden zu einer stetigen Zunahme der Genexpression. Lediglich in GEKI 02 Zellen zeigt sich eine unterschiedliche zeitliche Entwicklung, da hier die stärkste Induktion der *camp*-Expression durch eine Inkubation über 24 Stunden hervorgerufen wird.

Interessanterweise führt eine Co-Stimulation von T 84 Zellen mit 10% Intestamin[®] plus 4 mM Butyrat aber nicht zu einer stärkeren Zunahme der *camp*-Expression als die Einzelsubstanzen. Die Co-Stimulation bewirkt nach 48 Stunden lediglich eine gleich hohe Expression des Cathelicidin wie eine Stimulation mit 4 mM Butyrat.

Während über die Einzelsubstanzen, aus denen sich das enterale Ernährungssupplement Intestamin[®] zusammensetzt, verschiedene Untersuchungen vorliegen, ist über die Kombination der Substanzen und ihre Auswirkungen auf zellulärer Ebene wenig bekannt. Glutamin beispielsweise, das in großen Mengen in Intestamin[®] enthalten ist, führt als Einzelsubstanz sowohl in Kolonkarzinomzellen als auch in der Myelozytenzelllinie U 937 zu einem weniger differenzierten Phänotyp^{225, 226}. Die Kombination aus Glutamin, Tributyrin und Antioxidantien in Form des Intestamin[®] jedoch vermag in den Kolonkarzinomzelllinien SW 620 und HT 29 die Zellproliferation zu hemmen und die Differenzierung zu induzieren (Kudlich et al., bisher nicht veröffentlichte Ergebnisse). Die Differenzierung von Zellen spielt für die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 eine Rolle⁵³. Im Kolon wird LL-37 von den Zellen der epithelialen Oberflächen und den oberen Kryptenanteilen exprimiert. Dort finden sich die differenzierten Kolonzellen. In den tiefen Kryptenanteilen, wo die Zellproliferation stattfindet, lässt sich keine Expression des Cathelicidins nachweisen⁵³. Werden Kolonzellen mit Butyrat behandelt, zeigt sich sowohl ein Anstieg der AP-Aktivität, einem Marker für die Differenzierung von Zellen, als auch eine Zunahme der Expression von *camp*^{53, 103}.

Die Zelldifferenzierung und Expression des antimikrobiellen Peptids aber werden wahrscheinlich über verschiedene Signalwege übermittelt. Die Inhibition des MEK/ERK Signalweges in SW 620 Zellen drosselt die durch Butyrat induzierte LL-37 Expression, wobei die AP-Aktivität unbeeinflusst bleibt. Eine Blockierung des p38 MAPK Weges dagegen reduziert die durch Butyrat induzierte AP-Aktivität, ohne die Expression des Cathelicidins zu beeinflussen¹⁰³. In Keratinozyten jedoch reduziert eine Inhibition des p 38 MAPK Weges neben der Zelldifferenzierung auch die Expression des Cathelicidin Gens^{210, 227}. Dies könnte auch in dem Sinne gedeutet werden, dass mit zunehmender Zelldifferenzierung die Expression des Cathelicidins ansteigt und eine Hemmung der Zelldifferenzierung die LL-37 Expression zurückgehen lässt.

Die Zelldifferenzierung, die in kolorektalen Karzinomzellen durch Butyrat hervorgerufen wird, ist vergesellschaftet mit der Hochregulierung des Vitamin D-Rezeptors (VDR). Da Butyrat den VDR hochreguliert, an den Vitamin D₃ bindet, und über Zellzyklusregulatoren die Zelldifferenzierung beeinflusst, besitzen Vitamin D₃ und Butyrat hinsichtlich der Zelldifferenzierung synergetische Effekte^{145, 146}. Das bedeutet,

dass die durch Butyrat induzierte Zelldifferenzierung und Expression des Zellzyklusregulators p21^{WAF1/CIP1} über den VDR vermittelt werden^{145, 146}, wobei die Signalwege p 38 MAPK und TGF- β 1/Smad 3 beteiligt sind²²⁸.

Hinsichtlich der Differenzierung von Zellen besitzt Tributyrin die gleichen Effekte wie Butyrat. Es induziert die Zelldifferenzierung und reduziert die Proliferation²²⁹⁻²³¹. Die Inkubation von Kolonkarzinomzellen mit 1 mM Tributyrin steigert die AP-Aktivität bis zu 180fach im Vergleich zur Kontrolle, was bedeutet, dass Tributyrin die Differenzierung stark fördert²³⁰. In HT 29 Zellen waren die Auswirkungen von Tributyrin auf die Suppression des Zellwachstums und die Induktion der Differenzierung nachdrücklicher als die des Butyrat²³². Diese Effekte bewirkt das in Intestamin[®] enthaltene Tributyrin, ebenso wie das Butyrat, über die Steigerung des Zellzyklusregulators p21^{WAF1/CIP1}^{233, 234}, der eine komplexe Rolle bezüglich Zelldifferenzierung, Zellzykluskontrolle und Apoptose innehat²³⁵.

Auch Vitamin D₃ induziert die Zelldifferenzierung und wirkt hemmend auf die Proliferation^{214, 236, 237}. Die Behandlung von U 937 Zellen mit 1,25(OH)₂D₃ führt zur Differenzierung der Zellen unter Beteiligung des CDK-Inhibitors p21^{WAF1/CIP1}²³⁸. Neben der zellspezifischen Induktion von Cyklin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP1} auf transkriptionaler und translationaler Ebene ist dabei auch der Signalweg TGF- β beteiligt²³⁹. In Keratinozyten führt 1,25(OH)₂D₃ ebenfalls zur Induktion der Zelldifferenzierung²³⁷ und vermag die Expression des Cathelicidins zu steigern¹⁰⁴. Andere Substanzen, die, wie beispielsweise Calcium²⁺ oder all-trans-Retinonsäure die Differenzierung induzieren, steigern allerdings nicht die LL-37 Expression¹⁰⁴. Das Expressionsmuster des LL-37 in der Haut und im Kolon legt eine Korrelation zwischen der Expression des Cathelicidins und dem Status der zellulären Differenzierung nahe^{53, 103}. Jedoch ist es fraglich, ob die Induktion der Differenzierung alleine ausreicht, um das Cathelicidin zu induzieren.

4.5 Rolle des MEK/ERK Signalweges

Die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37, das unter anderem für die Abwehr von Mikroorganismen an Körperoberflächen von Bedeutung ist, stellt eine Strategie des angeborenen Immunsystems dar. 1,25(OH)₂D₃, Butyrat und Intestamin[®] sind exogene Faktoren, die in der Lage sind, die Expression des Cathelicidins anzuregen. Wie die Expression des LL-37 reguliert wird und welche intrazellulären Signalwege eine Rolle spielen, ist bislang noch nicht vollständig geklärt.

Bei der Induktion der *camp*-Expression durch Butyrat spielt der Signalweg MEK/ERK eine Rolle¹⁰³. Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen, wozu MEK/ERK, p 38 MAPK und JNK (c-Jun N-terminal Kinase) gehören, sind eine Gruppe von Serin/Threonin Kinasen. Diese Kinasen können, nachdem sie als Antwort auf extrazelluläre Stimuli durch Phosphorylierung aktiviert wurden, selbst im Zellkern Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch die Transkription beeinflussen¹⁰¹. MAP-Kinasen regulieren unter anderem Gene, die Zellwachstum und Zelldifferenzierung regeln und für Apoptose und Entzündung verantwortlich sind¹⁰².

Über den MAP-Kinase Signalweg MEK/ERK wird die durch Butyrat induzierte Expression des LL-37 in Kolonepithelzellen reguliert¹⁰³. Ob die Signaltransduktion über den MEK/ERK-Weg für den Einfluss von Vitamin D₃ und Intestamin[®] auf das Cathelicidin LL-37 von Bedeutung ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

U0126 ist ein spezifischer MEK 1 Inhibitor, der in den durchgeführten Versuchen dafür verwendet wurde, den Einfluss des MEK/ERK Signalweges auf die durch 1,25(OH)₂D₃, Butyrat und Intestamin[®] induzierte Expression des Cathelicidin Gens zu analysieren. Dazu wurden die Zellen 30 Minuten mit 10 µM U0126 behandelt, bevor die Testsubstanzen hinzugegeben, die Zellen für weitere 8, 24, oder 48 Stunden inkubiert und die exprimierte mRNA mittels Real-time PCR ausgewertet wurden.

Eine Stimulation der kolorektalen Karzinomzellen HT 29, T84, SW 480 und der Adenomzellen GEKI 02 mit 25 nM Vitamin D₃ plus U0126 über 8, 24 und 48 Stunden führte in keiner der getesteten Zelllinien zu einer verminderten Expression des *camp*-Gens im Vergleich zu einer Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃. Die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen MEK 1/2 Inhibitor U0126 zeigt, dass der MEK/ERK

Signalweg keinen Einfluss auf die Induktion des Cathelicidin Gens durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzt.

Bei der Induktion des *camp*-Gens durch Intestamin[®] allerdings sprechen die Ergebnisse für eine Involvierung des MEK/ERK Weges. Stimuliert man HT 29 und T 84 Zellen über 8, 24 und 48 Stunden mit U0126 plus 10% Intestamin[®] wird die durch Intestamin[®] induzierte Expression des LL-37 stark vermindert. In SW 620 Zellen lässt sich durch die Blockade des MEK/ERK keine eindeutige Reduktion der *camp*-Expression nachweisen. Lediglich nach 8, nicht aber nach 24 oder 48 Stunden, wird eine Abnahme der durch Intestamin[®] induzierten LL-37 Expression erreicht. In GEKI 02 Zellen erzielt eine Behandlung der Zellen mit U0126 plus 10% Intestamin[®] nach 24 Stunden eine Abnahme der Genexpression, während nach 48 Stunden ein Rückgang um 50% keine signifikante Reduktion der *camp*-Expression im Vergleich zu einer Behandlung mit Intestamin[®] darstellt.

Dass der MEK/ERK Weg an der Induktion des *camp*-Gens durch Butyrat beteiligt ist, wies Schaubert erstmals 2004 an HT 29 Zellen nach¹⁰³⁹. Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Vergleicht man zudem die Beeinflussung der *camp*-Expression nach Stimulation der Zellen mit 10% Intestamin[®] plus U0126 mit der Behandlung der Zellen mit 4 mM Butyrat plus U0126, lassen sich Analogien finden. In HT 29 Zellen wird die Expression von LL-37 sowohl durch eine Inkubation der Zellen mit 10% Intestamin[®] plus U0126, als auch durch 4 mM Butyrat plus U0126 vermindert, was eine Beteiligung des MEK/ERK Signalweges aufzeigt. In SW 620 Zellen dagegen wird weder durch 10% Intestamin[®] plus U0126 noch durch 4 mM Butyrat plus U0126 eine Reduktion der Genexpression erreicht. Eine Behandlung der GEKI 02 Zellen mit 4 mM Butyrat plus U0126 bewirkt nach 8, 24 und 48 Stunden eine Verminderung der *camp*-Expression im Vergleich zu einer Inkubation mit Butyrat alleine. Für die Stimulation mit 10% Intestamin[®] plus U0126 lässt sich einzig nach 24 Stunden eine Abnahme der Expression des Cathelicidin Gens nachweisen.

Die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen MEK 1/2 Inhibitor U0126 zeigt, dass der MEK/ERK Signalweg zwar keinen Einfluss auf die Induktion des Cathelicidin Gens

durch Vitamin D₃ besitzt, bei der Induktion des *camp*-Gens durch Intestamin[®] allerdings wahrscheinlich involviert ist. Warum sich eine Behandlung mit dem spezifischen MEK 1 Inhibitor U0126 in Kombination mit Intestamin[®] nicht auf alle Zellen in gleicher Weise auswirkt, nämlich im Sinne einer Blockierung der Induktion der *camp*-Expression, ist unklar. Über die Gründe dieses Phänomens kann jedoch nur spekuliert werden. Interessanterweise zeigt sich dieses Phänomen auch für Butyrat. Nicht nur in unserer Versuchreihe mit SW 620 Zellen, sondern auch in der hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 wird eine durch Butyrat induzierte Steigerung der Expression des *camp*-Gens nicht durch den Inhibitor U0126 blockiert¹⁰⁵. Möglicherweise könnte dieses Phänomen durch den spezifischen Zelltyp bedingt sein.

Die Mechanismen, über die eine Inkubation von Kolonepithelzellen mit 1,25(OH)₂D₃ zu einer Steigerung des Cathelicidin Gens führt, sind nicht bekannt. Der Signalweg MEK/ERK hat in Kolonepithelzellen keinen Einfluss auf die Induktion der *camp*-Expression durch Vitamin D₃. In Keratinozyten jedoch ist der MEK/ERK Signalweg an der Steigerung der *camp*-Expression durch 1,25(OH)₂D₃ beteiligt. Eine Inkubation von Keratinozyten mit dem Inhibitor U0126 blockierte die durch Vitamin D₃ hervorgerufene Zunahme der LL-37 Expression¹⁰⁴. Da Kolonepithelzellen und Keratinozyten anderen (Umwelt)-Einflüssen ausgesetzt sind und sich in verschiedenen Milieus befinden, könnte es allerdings sein, dass die Signaltransduktion bezüglich der Expression des Cathelicidin Gens zellspezifisch ist und daher in Kolonzellen und Hautzellen unterschiedliche Signalwege eine Rolle spielen. Ähnliches zeigt sich auch für die Effekte von Butyrat auf die *camp*-Expression in Keratinozyten und Kolonzellen. Butyrat, das im Kolon wichtige Funktionen erfüllt, induziert die Expression des Cathelicidin Gens in Kolonepithelzellen, vermag sie aber in Keratinozyten, für die Butyrat physiologisch nicht von Bedeutung ist, nicht zu beeinflussen¹⁰⁴.

Die Behandlung von Kolonepithelzellen mit dem spezifischen MEK 1 Inhibitor U0126 legt eine Beteiligung des Signalweges MEK/ERK bei der Induktion des Cathelicidin Gens durch Intestamin[®] nahe. Intestamin[®], das sich aus Tributyrin, Glutamin und Antioxidantien, wie Zink, Selen, Vitamin C, E und β -Carotin zusammensetzt, vermag

das *camp*-Gen zu induzieren. Ein wichtiger Bestandteil dafür ist das Tributyrin, aus dem Butyrat freigesetzt wird²²³. Auf die Signalübertragung, die die Steigerung der *camp*-Expression durch Butyrat vermittelt, hat der MAP-Kinase Weg MEK/ERK Einfluss, was unter anderem in HT 29 Zellen nachgewiesen wurde¹⁰³⁻¹⁰⁵. Bekanntermaßen bewirkt die Behandlung von HT 29 Zellen mit Butyrat eine Zunahme der Expression des Cathelicidin Gens. Der PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) und der VDR stellen dabei Zielgene für Butyrat dar und werden durch die kurzkettige Fettsäure hochreguliert^{130, 145, 240}. Beides sind Liganden abhängige Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der nukleären Hormon-Rezeptoren gehören²⁴¹. Durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren können die Signalwege, die bei der Induktion von *camp* durch Butyrat von Bedeutung sind, analysiert werden. Eine Inhibition des VDR, nicht aber des PPAR- γ führt zu einer Reduktion der durch Butyrat erzielten *camp*-Induktion²⁴². Weiterhin konnten spezifische Inhibitoren von p38 MAPK, ERK1/2 und TGF- β 1 die durch die kurzkettige Fettsäure induzierte Expression des Cathelicidin Gens hemmen. Dies bedeutet, dass die Induktion der *camp*-Expression durch verschiedene Signalwege und Rezeptoren, nämlich den VDR, p38 MAPK, ERK1/2 und TGF- β 1, nicht aber durch den PPAR- γ beeinflusst wird²⁴².

Ein erhöhter Phosphorylierungsgrad des p38 MAPK Signalweges durch Butyrat wird für verschiedene Zelllinien demonstriert²⁴³. In der menschlichen Lungenzelllinie EBC-1 wird die Transaktivierung des Cathelicidin Promoters, die durch Butyrat hervorgerufen wird, durch spezifische Inhibitoren der MAP-Kinasen blockiert²¹⁰. Eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Activator Protein 1, die in der Promoterregion des Cathelicidins lokalisiert ist, ist in die durch Butyrat induzierte *camp*-Expression einbezogen. Die Aktivierung des AP-1 kann über die 3 MAP-Kinasen erfolgen, nämlich p38 MAPK, MEK/ERK und JNK²⁴⁴. Eine Blockade der 3 MAP-Kinasen mittels spezifischer Inhibitoren oder eine Deletion dieser AP-1 Bindungsstelle hebt die durch Butyrat erzielte Induktion der Cathelicidin Expression auf, was sowohl die Beteiligung des AP-1, als auch die der MAP-Kinasen aufzeigt²¹⁰.

Schauber vertritt bezüglich des p38 MAPK Weges eine andere Meinung. Er legte dar, dass eine Blockade des p 38 MAPK Weges in Kolonzellen zwar die Aktivität des alkalischen Phosphatase (AP), die einen Marker für die Zelldifferenzierung darstellt, hemmt, nicht jedoch die durch Butyrat induzierte Steigerung der LL-37 Expression¹⁰³.

Für Schaubers Meinung spricht zudem die Tatsache, dass bei der Induktion des antimikrobiellen Peptides HBD-2 durch Sulforaphan der MEK/ERK Signalweg, nicht aber der p38 MAPK Weg involviert ist. Sulforaphan, das ebenso wie Butyrat ein Inhibitor der Histondeacetylase ist, vermag in den intestinalen Epithelzellen HT 29, Caco 2 und SW 480, die Expression des antimikrobiellen Peptides, HBD-2 zu stimulieren. An der Induktion des HBD-2 durch Sulforaphan sind der VDR und der MEK/ERK Signalweg beteiligt, nicht aber der PPAR- γ und p 38 MAPK Weg²¹³. Es ist anzunehmen, dass der Raf-MEK/ERK Signalweges in die Induktion des antimikrobiellen Peptides HBD-2 in epithelialen Zellen involviert ist²⁴⁵.

4.6 Antimikrobielle Aktivität von HT 29 Zellen gegenüber *E.coli*

Der Darm, der in ständigem Kontakt mit unzähligen Mikroorganismen steht, verfügt über spezielle Mechanismen zur Abwehr krankheitserregender Keime. Eine Strategie des angeborenen Immunsystems stellt die Produktion antimikrobieller Peptide dar, die, zusätzlich zur mechanischen Mukosabarriere aus einzelliger Epithelschicht, eine chemische Barriere gegen potentielle Eindringlinge bildet^{2, 3}. Antimikrobielle Peptide besitzen ein weites Spektrum an mikrobizider Aktivität gegenüber Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen¹⁹⁻²². Verschiedenen Eigenschaften befähigen AMPs, mit Biomembranen zu interagieren und diese zu zerstören.

1,25(OH)₂D₃, Butyrat und Intestamin[®] können die Expression des antimikrobiellen Peptides LL-37 beeinflussen. Ob eine Stimulation von HT 29 Zellen mit diesen Substanzen die antimikrobielle Aktivität der Zellen gegenüber *E.coli* K12 zu verstärken vermag, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Um dies zu analysieren, wurde wie im Teil Material und Methoden beschrieben, ein Überlebensassay durchgeführt. Beispielhaft wurde die Zelllinie HT 29 verwendet. HT 29 Zellen zeigen bereits unbehandelt eine antimikrobielle Aktivität gegenüber *E.coli*. Diese kann jedoch durch eine Inkubation der Zellen mit 4 mM Butyrat und 25 nM

1,25(OH)₂D₃ nicht verstärkt werden. Obwohl Vitamin D₃ und Butyrat in HT 29 Zellen die Expression des Cathelicidin Gens *camp* induzieren, zeigen die behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine verstärkte antimikrobielle Aktivität gegenüber *E.coli*.

Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen verschiedener Forschungsgruppen, die eine verstärkte antimikrobielle Aktivität von Zellen nach Stimulation mit Vitamin D₃ und Butyrat zeigen konnten. Vitamin D₃ vermag in einigen Zellen, beispielsweise Kolonzellen, Keratinozyten, Neutrophilen, Monozyten, Lungenadenomzellen und squamösen Karzinomzellen, die *camp*-Expression zu steigern¹⁹⁴. Werden Lungenadenomzellen und squamöse Karzinomzellen über 48 Stunden mit 1,25-(OH)₂D₃ stimuliert, zeigen sie eine verstärkte antimikrobielle Aktivität gegenüber *E.coli* und *Pseudomonas aeruginosa*¹⁹⁴, einem Keim, der für viele Infektionen von Patienten mit Cystischer Fibrose verantwortlich ist²⁴⁶.

Auch Keratinozyten, die mit Vitamin D₃ oder mit Vitamin D₃ plus Butyrat behandelt werden, verringern das bakterielle Wachstum von *S. aureus* im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen²¹⁶, wobei weder Butyrat noch Vitamin D₃ selbst antimikrobiell wirken¹⁰⁴. In Schaubers Versuchen zeigten HT 29 Zellen, die mit Butyrat stimuliert wurden, ebenfalls eine stärkere Inhibition des bakteriellen Wachstums von *S.aureus* als nicht-stimulierte Kontrollzellen¹⁰⁴.

Warum eine Stimulation von HT 29 Zellen mit 1,25(OH)₂D₃ und Butyrat, die zu einer erhöhten Expression von *camp* führt, die antimikrobielle Aktivität gegenüber *E.coli* in unserem Versuch nicht steigern kann, ist unklar.

Die antimikrobielle Aktivität lässt sich am Durchmesser der transparenten Bereiche ablesen. Das von den Zellen synthetisierte LL-37 wird in die Gelmatrix der Agarplatten abgegeben und lysiert die darin immobilisierten Bakterien im Umkreis der Ausstanzungen, in die die Zellsuspensionen gegeben wurden.

Für die antimikrobielle Wirkung des Cathelicidins ist das Mikromilieu der Umgebung von Bedeutung. Neben der Konzentration des Peptids spielen insbesondere der pH-Wert und die Salzkonzentration eine wichtige Rolle, da sie die Ausbildung der Sekundärstruktur, nämlich der α -helikalen Konformation, des LL-37 beeinflussen⁷⁰. Das

Ausmaß der räumlichen Konformation korreliert mit der antibakteriellen Wirkung des LL-37 gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien. Eine starke Ausprägung der α -helikalen Konformation resultiert in einer nachhaltigen antimikrobiellen Aktivität des Peptids, während eine geringere Ausprägung der α -Helix oder ein Verlust der Konformation mit einem Verlust der antimikrobiellen Wirkung des Peptids einhergehen.

Für die Interaktion des Cathelicidins mit Biomembranen ist demnach die Ausbildung der α -Helix erforderlich⁷⁰. Über diese beeinflusst zudem der pH-Wert der Umgebung die antimikrobielle Aktivität des LL-37. Die α -helikale Konformation des Cathelicidins bleibt bis zu einem pH-Wert von 13 erhalten. Unter einem pH-Wert von 5 verliert das Peptid seine Sekundärstruktur und bei einem pH-Wert von 2 befindet es sich in einem ungeordneten Zustand⁷⁰. Um bei niedrigem pH-Wert eine bakterizide Wirkung hervorzurufen, werden höhere Dosen an LL-37 benötigt. Die Effektivdosis ED₅₀, die benötigt wird, um 50% des Bakterienwachstums zu inhibieren, beträgt gegenüber *S.aureus* bei neutralem pH-Wert (7,4) 0,23 μ g/ml, bei saurem pH-Wert (4,6) das Vierfache. Gegenüber *E.coli* (Stamm NIHJ JC-2) betrug die ED₅₀ bei saurem pH-Wert verglichen mit der ED₅₀ bei neutralem pH-Wert das Siebenfache²⁴⁷. Dass LL-37 auch im Magen, beispielsweise gegenüber *Helicobacter pylori* seine Wirksamkeit entfalten kann²⁴, liegt an den anatomischen Gegebenheiten. Im Magen existiert ein großer pH-Gradient über der Schleimschicht, die dem Epithel aufsitzt. Der pH-Wert variiert von etwa 2 im Magenumen bis etwa 7 in der Schleimschicht, die direkt dem Epithel aufsitzt²⁴⁸. LL-37, das von den oberflächlichen Epithelzellen exprimiert wird, entfaltet dort seine antimikrobielle Aktivität gegenüber *H.pylori*.²⁴

Für die Formation der α -Helix und die antimikrobielle Aktivität des LL-37 ist auch die Salzkonzentration des umgebenden Mediums von Bedeutung⁴⁵. Die antimikrobielle Aktivität des Peptids wird bestimmt über die minimale inhibitorische Konzentration (MIC), die benötigt wird, um Bakterien in Anwesenheit von Medien in ihrem Wachstum zu hemmen. In salzarmen Medien ohne zugesetztes NaCl hat LL-37 eine MIC < 10 mg/ml, um Bakterien, wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis* oder *Staphylococcus aureus*, zu töten²⁴⁹. Unter Anwesenheit von 100 mM NaCl vermindert sich die antimikrobielle Aktivität des LL-37 um den Faktor 2 bis 8²⁴⁹. Auch

gegenüber *E.coli* D31 verringert sich die bakterizide Wirkung des Cathelicidins um den Faktor 4 bis 5 nach Anhebung der NaCl Konzentration von 60 auf 155 mM⁵⁰. Mit steigendem Salzgehalt werden also höhere Dosen an LL-37 erforderlich, um die Wirksamkeit des LL-37 gegenüber Mikroorganismen, beispielsweise *E.coli* und *S.aureus*, zu gewährleisten^{250, 251}.

Im Versuch, die physiologischen Bedingungen im Körper zu imitieren, wird oftmals NaCl zu den Kulturmedien zugegeben. Die Zugabe des Salzes verringert jedoch die antimikrobielle Aktivität des LL-37. Kulturmedien haben über die Beeinflussung des umgebenden Mikromilieus Auswirkungen auf die antimikrobielle Aktivität des Cathelicidins. Agerberth konnte zeigen, dass LL-37 in Luria-Bertani (LB) Medium eine moderate antibakterielle Aktivität besaß, nach Zugabe von Medium E jedoch, das für die Kultivierung von *E.coli* verwendet wird²⁵², seine antimikrobielle Aktivität steigern konnte. Diese Verbesserung der bakteriziden Wirkung korrelierte mit der Induktion der α -helikalen Struktur des Peptids⁴⁵. In Anwesenheit von Zellkulturmedien wie DMEM besitzt LL-37 dagegen keine bakterizide Wirkung auf *S. typhimurium* oder *S.aureus*²⁵³.

Neben dem im Versuch verwendeten Luria-Bertani Medium, das über die Beeinflussung des Mikromilieus Auswirkungen auf die antimikrobielle Aktivität des Cathelicidins hat, ist auch die Konzentration des von den HT 29 Zellen produzierten LL-37 für die bakterizide Wirkung gegenüber *E.coli* von Bedeutung. Um einen bakteriziden Effekt gegenüber *E.coli* zu erreichen, wird eine minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von 2 μ M synthetischem LL-37 benötigt (Dr. D. Rogoll, persönliche Mitteilung). Die Konzentration des von HT 29 Zellen synthetisierten LL-37 ist für eine bakterizide Wirkung gegenüber *E.coli* ausreichend, wie an den transparenten Hemmhöfen, die die antimikrobielle Aktivität der Zellen widerspiegeln, zu sehen ist. Die antimikrobielle Aktivität, die die Zellen bereits unbehandelt zeigen, kann durch eine Inkubation der Zellen mit 4 mM Butyrat und 25 nM Vitamin D₃ jedoch nicht verstärkt werden, obwohl 1,25(OH)₂D₃ und Butyrat die Expression des Cathelicidin Gens *camp* induzieren. Dies könnte womöglich dadurch bedingt sein, dass die Zellen nach der Stimulation mit Vitamin D₃ und Butyrat zwar mehr LL-37 synthetisieren, aber die Konzentration des Peptids nicht ausreicht, um im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine deutliche Vergrößerung des Durchmessers der transparenten, lysierten Bereiche hervorzurufen.

Auch könnte die Einbettung der Zellsuspension in den Agar eine chemische Reaktion zur Folge haben, die die Wirkung des LL-37 abschwächt. Eine pH-Verschiebung beispielsweise könnte bewirken, dass das LL-37, das in einem Milieu mit neutralem pH-Wert eine positive Ladung von +6 und amphipathischen Charakter besitzt, seine mikrobizide Wirkung über die Bindung an negativ geladene Biomembranen nicht effektiv vermitteln kann^{26, 254}. Die Elektrolytzusammensetzung des umgebenden Mediums könnte ebenso die Ausbildung der α -helikalen Konformation und damit die bakterizide Wirkung des Peptids beeinflussen⁸¹.

Die antimikrobielle Aktivität des Cathelicidins wurde bisher gegenüber pathogenen Keimen nachgewiesen. Unterschiedliche Membranstrukturen und Pathogenitätsfaktoren, die krankheitserregende Keime aufweisen, könnten die Bioaktivität des Peptids beeinflussen. Daher könnte es auch von Bedeutung sein, dass der verwendete *E.coli* K12 Stamm ein apathogener Keim ist, der zur natürlichen Darmflora gehört und somit für den gesunden Organismus keine Gefährdung darstellt.

5 Zusammenfassung

In ständigem Kontakt mit zahlreichen Mikroorganismen benötigt unser Körper eine Vielzahl an Mechanismen zur Abwehr krankheitserregender Keime. Antimikrobielle Peptide unterstützen als Effektormoleküle die einzellige Epithelschicht des Darms, die als Mukosabarriere unseren Körper vor dem Eindringen pathogener Keime bewahrt. Die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37, auch Cathelicidin genannt, stellt eine Strategie des angeborenen Immunsystems zur Abwehr von Mikroorganismen im Kolon dar. Die Expression des Cathelicidin Gens *camp* kann, wie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, durch exogene Faktoren, wie die biologisch aktive Form des Vitamin D₃, das 1,25(OH)₂D₃, die kurzkettige Fettsäure Butyrat und das Ernährungssupplement Intestamin[®], angeregt werden. Die Stimulation der Zellen mit den genannten Substanzen führte in allen getesteten Zelllinien zeit- und dosisabhängig zu einer Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens.

Die Induktion der *camp*-Expression durch 1,25(OH)₂D₃ wird durch die Existenz eines Vitamin D Response Elements (VDRE) in der Promoterregion des *camp*-Gens begründet, an das der Vitamin D-Rezeptor Komplex als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor bindet und die Genexpression vermittelt. Die Auswirkungen von Butyrat auf die Genexpression des Cathelicidins werden auf die Modifikation des Acetylierungsstatus der Histonproteine zurückgeführt. Butyrat bewirkt durch eine reversible Hemmung der Histondeacetylase die Hyperacetylierung bestimmter Kernhistone und greift auf diese Weise in die Regulation der Gentranskription ein. Das enterale Ernährungssupplement Intestamin[®], das als Pharmakonutrition speziell für schwerkranke Patienten entwickelt wurde, ist reich an Glutamin-Dipeptiden, Tributyrin und Antioxidantien. Der Effekt, den Intestamin[®] auf die Expression des Cathelicidin Gens ausübt, ist wahrscheinlich auf Tributyrin zurückzuführen. Tributyrin, der Ester aus Glycerin und Butyrat, wird durch Hydrolyse zu Butyrat umgesetzt und bewirkt vermutlich die Steigerung der *camp*-Expression.

Eine Co-Stimulation von GEKI 02 Zellen mit 1,25(OH)₂D₃ plus Butyrat erzielte nach 48 Stunden eine weitere Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens gegenüber beiden Einzelsubstanzen. In allen anderen getesteten Zelllinien zeigte sich keine synergetische Wirkung der beiden Substanzen. Auch eine Co-Stimulation mit

Intestamin[®] plus Butyrat konnte nicht zu einer stärkeren Zunahme der *camp*-Expression führen als eine Behandlung mit beiden Einzelsubstanzen.

Eine synergetische Wirkung der Substanzen 1,25(OH)₂D₃ und Butyrat in GEKI 02 Zellen könnte durch die Acetylierung der Histone bedingt sein, die eine Auflockerung der Chromatinstruktur bewirkt, was wiederum die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie dem Vitamin D-Rezeptor Komplex erleichtert. Die fehlende synergetische Wirkung in allen anderen getesteten Zelllinien könnte mit der Tatsache in Zusammenhang stehen, dass die Induktion der *camp*-Expression zeitabhängig ist: Vitamin D₃ erzielte nach 24 Stunden, Butyrat nach 48 Stunden die deutlichsten Auswirkungen auf die Genexpression des Cathelicidins.

Der Einfluss des MEK/ERK Signalweges auf die durch 1,25(OH)₂D₃, Butyrat und Intestamin[®] induzierte *camp*-Expression wurde in den durchgeführten Versuchen mittels des spezifischen MEK 1/2 Inhibitors U0126 untersucht. U0126 blockierte die Induktion des Cathelicidin Gens durch Intestamin[®] und Butyrat, was die Beteiligung des Signalweges MEK/ERK belegt. Vitamin D₃ dagegen übt seinen Einfluss auf LL-37 nicht über den Signalweg MEK/ERK aus.

Obwohl Vitamin D₃ und Butyrat die Expression des Cathelicidin Gens *camp* induzieren, konnte die Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen die antimikrobielle Aktivität der Kolonepithelzellen gegenüber *E.coli* im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nicht steigern. Ursächlich hierfür könnte neben der Wahl eines apathogenen Bakterienstammes das Mikromilieu der Umgebung sein. Außer der Konzentration des Peptids spielen insbesondere der pH-Wert und die Salzkonzentration des Kulturmediums eine wichtige Rolle, da sie die Ausbildung der Sekundärstruktur, nämlich der α -helikalen Konformation, des LL-37 beeinflussen, die für die Interaktion mit Biomembranen erforderlich ist.

Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber herkömmlichen Antibiotika, wächst das Interesse an der Erforschung antimikrobieller Peptide. Exogene Faktoren wie 1,25(OH)₂D₃, Butyrat und Intestamin[®] können eine Steigerung der Expression des Cathelicidin Gens erzielen. Ob sich dieser Effekt allerdings auch *in-vivo* zeigt und eventuell therapeutischen Einsatz finden könnte, müssen weitere Studien klären.

6 Abkürzungsverzeichnis

AMP: Antimikrobielles Peptid

AP: Alkalische Phosphatase

AP-1: Aktivator Protein 1

But: Butyrat

Camp: Cathelicidin antimicrobial peptide

CD: Cluster of Differentiation

cDNA: Komplementäre Desoxyribonukleinsäure

CDK: Cyclin-dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)

cJNK: C-Jun N-terminale Kinase

CRAMP: Cathelin related antimicrobial peptide

CYP: Cytochrom P450

DBP: Vitamin D bindendes Protein

DEPC-H₂O: Diethylpyrocarbonat-Wasser

dH₂O: Destilliertes Wasser

DMEM: Dulbecco Modified Egel's Minimal Essential Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

Dtl.: Deutschland

ED: Effektivdosis

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ERK: Extracellular signal-regulated protein kinase

FBS: Fetales bovines Serum

FPRL-1: Formyl peptide receptor-like 1

GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

HAT: Histonacetyltransferase

HDAC: Histondeacetylase

HBD: Humanes Beta-Defensin

hCAP-18: Human cationic antimicrobial protein 18

HEPES Buffer: N-2-Hydroxyethyl Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure

IFN: Interferon

IL: Interleukin

LB- Medium: Luria-Bertani- Medium

LL-37: Humanes antimikrobielles Peptid aus der Familie der Cathelicidine

LPS: Lipopolysaccharid

M: Molar

MAP: Mitogen-activated protein

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MEK/ERK 1/2: Mitogen/extracellular signal-regulated protein kinase 1/2

MEM: Minimum Essential Medium

MIC: minimale inhibitorische Konzentration

ml: Milliliter

mM: Millimolar

MODS: Multiple organ dysfunction syndrome

mRNA: Messenger RNA

NaCl: Natriumchlorid

NEAA: Nicht-essentielle Aminosäuren (non essential amino acids)

NF- κ B: Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer

nM: Nanomolar

PBS: Phospat gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline)

PAMP: Pathogen associated molecular pattern

PPAR: Peroxisome proliferator activated receptor

PRP: Pattern recognition receptor

P2X₇: Purinerge Rezeptor P2X₇

rhEGF: Epidermal Growth Factor, human, recombinant

RNA: Ribonukleinsäure

RPMI 1640 Medium: Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium

RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RXR: Retinoid X Rezeptor

SD: Standardabweichung

SCFA: Short chain fatty acid (Kurzkettenige Fettsäure)

SINE: Short interspersed nuclear element

SIRS: Systemic inflammatory response syndrome

SRC: Steroid receptor coactivator

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tumornekrosefaktor

TLR: Toll-like receptor

U: Units

U/min: Umdrehungen pro Minute, 10000 rpm (rounds per minute) entsprechen
16060g

VDR: Vitamin D-Rezeptor

VDRE: Vitamin D response element

7 Literaturverzeichnis

1. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313-8.
2. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389-95.
3. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861.
4. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50-3.
5. Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. *N Engl J Med* 2002;347:1199-200.
6. Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *Journal of leukocyte biology* 2001;69:691-7.
7. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology letters* 2005;27:1337-47.
8. Patil A, Hughes AL, Zhang G. Rapid evolution and diversification of mammalian alpha-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics* 2004;20:1-11.
9. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 1998;152:1247-58.
10. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:710-20.
11. Gudmundsson GH, Magnusson KP, Chowdhary BP, Johansson M, Andersson L, Boman HG. 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* 1995;92:7085-9.

12. Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:1408-25.
13. Zaiou M, Nizet V, Gallo RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *The Journal of investigative dermatology* 2003;120:810-6.
14. Zhu S, Wei L, Yamasaki K, Gallo RL. Activation of cathepsin L by the cathelin-like domain of protegrin-3. *Molecular immunology* 2008.
15. Honey K, Rudensky AY. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2003;3:472-82.
16. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001;97:3951-9.
17. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 1996;238:325-32.
18. Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2000;55:31-49.
19. Schroder JM, Harder J. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:469-86.
20. Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6:447-56.
21. Bergman P, Walter-Jallow L, Broliden K, Agerberth B, Soderlund J. The Antimicrobial Peptide LL-37 Inhibits HIV-1 Replication. *Curr HIV Res* 2007;5:410-5.
22. Howell MD, Jones JF, Kisich KO, Streib JE, Gallo RL, Leung DY. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J Immunol* 2004;172:1763-7.
23. Iimura M, Gallo RL, Hase K, Miyamoto Y, Eckmann L, Kagnoff MF. Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens. *J Immunol* 2005;174:4901-7.

24. Hase K, Murakami M, Iimura M, et al. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2003;125:1613-25.
25. Lopez-Garcia B, Lee PH, Yamasaki K, Gallo RL. Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *The Journal of investigative dermatology* 2005;125:108-15.
26. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997;349:418-22.
27. Sevcsik E, Pabst G, Richter W, Danner S, Amenitsch H, Lohner K. Interaction of LL-37 with model membrane systems of different complexity - Influence of the lipid matrix. *Biophys J* 2008.
28. Sood R, Domanov Y, Pietiainen M, Kontinen VP, Kinnunen PK. Binding of LL-37 to model biomembranes: Insight into target vs host cell recognition. *Biochim Biophys Acta* 2007.
29. Sevcsik E, Pabst G, Jilek A, Lohner K. How lipids influence the mode of action of membrane-active peptides. *Biochim Biophys Acta* 2007.
30. Henzler-Wildman KA, Martinez GV, Brown MF, Ramamoorthy A. Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry* 2004;43:8459-69.
31. Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1999;38:7235-42.
32. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 1999;341 (Pt 3):501-13.
33. Henzler Wildman KA, Lee DK, Ramamoorthy A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 2003;42:6545-58.
34. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002;3:1033-40.

35. Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 2002;10:179-86.
36. Lysenko ES, Gould J, Bals R, Wilson JM, Weiser JN. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infection and immunity* 2000;68:1664-71.
37. Peschel A, Jack RW, Otto M, et al. Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* 2001;193:1067-76.
38. Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, et al. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother* 2008.
39. Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M, Miller SI. A PhoP-regulated outer membrane protease of Salmonella enterica serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* 2000;182:4077-86.
40. Ernst RK, Yi EC, Guo L, et al. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway Pseudomonas aeruginosa. *Science* 1999;286:1561-5.
41. Shafer WM, Qu X, Waring AJ, Lehrer RI. Modulation of Neisseria gonorrhoeae susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1829-33.
42. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, et al. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 2001;7:180-5.
43. Gennaro R, Skerlavaj B, Romeo D. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infection and immunity* 1989;57:3142-6.
44. Zanetti M, Litteri L, Gennaro R, Horstmann H, Romeo D. Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. *J Cell Biol* 1990;111:1363-71.

45. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:195-9.
46. Agerberth B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96:3086-93.
47. Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* 2003;170:2274-8.
48. Sorensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood* 1997;90:2796-803.
49. Braff MH, Di Nardo A, Gallo RL. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *The Journal of investigative dermatology* 2005;124:394-400.
50. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9541-6.
51. Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res* 2005;30:385-94.
52. Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sorensen O, Weber G, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infection and immunity* 1999;67:2561-6.
53. Hase K, Eckmann L, Leopard JD, Varki N, Kagnoff MF. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infection and immunity* 2002;70:953-63.

54. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Schitteck B, Garbe C, Gallo RL. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *The Journal of investigative dermatology* 2002;119:1090-5.
55. Stoeckelhuber M, Messmer EM, Schubert C, et al. Immunolocalization of defensins and cathelicidin in human glands of Moll. *Ann Anat* 2008.
56. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 2002;81:845-50.
57. Welsch U, Oppermann T, Morteza M, Hofter E, Unterberger P. Secretory phenomena in the non-lactating human mammary gland. *Ann Anat* 2007;189:131-41.
58. Murakami M, Dorschner RA, Stern LJ, Lin KH, Gallo RL. Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatr Res* 2005;57:10-5.
59. Malm J, Sorensen O, Persson T, et al. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infection and immunity* 2000;68:4297-302.
60. Frohm M, Gunne H, Bergman AC, et al. Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur J Biochem* 1996;237:86-92.
61. Termen S, Tollin M, Olsson B, Svenberg T, Agerberth B, Gudmundsson GH. Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:536-49.
62. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001;414:454-7.
63. Rosenberger CM, Gallo RL, Finlay BB. Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2422-7.
64. Schaubert J, Ruzicka T, Rupec RA. [Cathelicidin LL-37 : A central factor in the pathogenesis of inflammatory dermatoses?]. *Hautarzt* 2008;59:72-4.
65. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 2007;13:975-80.

66. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;449:564-9.
67. Conner K, Nern K, Rudisill J, O'Grady T, Gallo RL. The antimicrobial peptide LL-37 is expressed by keratinocytes in condyloma acuminatum and verruca vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:347-50.
68. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002;347:1151-60.
69. Putsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet* 2002;360:1144-9.
70. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem* 1998;273:3718-24.
71. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Wilson JM. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* 1999;103:1113-7.
72. Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C, et al. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infection and immunity* 2008;76:935-41.
73. Chromek M, Slamova Z, Bergman P, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 2006;12:636-41.
74. Zasloff M. Defending the epithelium. *Nat Med* 2006;12:607-8.
75. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006;79:439-48.
76. Schaubert J, Rieger D, Weiler F, et al. Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:615-21.

77. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18129-34.
78. Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:32-8.
79. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol* 2002;169:3883-91.
80. Kirikae T, Hirata M, Yamasu H, et al. Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infection and immunity* 1998;66:1861-8.
81. Bals R, Wilson JM. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:711-20.
82. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infection and immunity* 1995;63:1291-7.
83. De Y, Chen Q, Schmidt AP, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 2000;192:1069-74.
84. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 2002;106:20-6.
85. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Human cathelicidin LL-37 increases vascular permeability in the skin via mast cell activation, and phosphorylates MAP kinases p38 and ERK in mast cells. *J Dermatol Sci* 2006;43:63-6.
86. von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 2008.
87. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol* 2004;172:1146-56.

88. Berkestedt I, Nelson A, Bodelsson M. Endogenous antimicrobial peptide LL-37 induces human vasodilatation. *British journal of anaesthesia* 2008.
89. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 2003;111:1665-72.
90. Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz JC, Vargas-Zuniga LM, Cancino-Diaz ME. LL-37 regulates the overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and c-IAP-2 in human keratinocytes. *Int J Dermatol* 2008;47:457-62.
91. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, et al. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *The Journal of investigative dermatology* 2003;120:379-89.
92. Heilborn JD, Nilsson MF, Jimenez CI, et al. Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *International journal of cancer* 2005;114:713-9.
93. Coffelt SB, Scandurro AB. Tumors sound the alarmin(s). *Cancer Res* 2008;68:6482-5.
94. Coffelt SB, Waterman RS, Florez L, et al. Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *International journal of cancer* 2008;122:1030-9.
95. Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, et al. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol* 2003;171:6690-6.
96. Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol* 2004;172:4987-94.
97. Schaubert J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol* 2008.
98. Bowdish DM, Davidson DJ, Speert DP, Hancock RE. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol* 2004;172:3758-65.

99. Zheng Y, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils. *Br J Dermatol* 2007.
100. Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* 2005;175:1776-84.
101. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 1995;9:726-35.
102. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22:153-83.
103. Schaubert J, Svanholm C, Termen S, et al. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 2003;52:735-41.
104. Schaubert J, Dorschner RA, Yamasaki K, Brouha B, Gallo RL. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology* 2006;118:509-19.
105. Schaubert J, Iffland K, Frisch S, et al. Histone-deacetylase inhibitors induce the cathelicidin LL-37 in gastrointestinal cells. *Molecular immunology* 2004;41:847-54.
106. Gaudreault E, Gosselin J. Leukotriene B4 Induces Release of Antimicrobial Peptides in Lungs of Virally Infected Mice. *J Immunol* 2008;180:6211-21.
107. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Faseb J* 2005;19:1067-77.
108. Mellanby E. An experimental investigation on rickets. *Lancet* 1919;1:407-12.
109. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 1998;78:1193-231.
110. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *American journal of physiology* 2005;289:F8-28.
111. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002;8:174-9.

112. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, et al. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980;210:203-5.
113. Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev* 1989;10:294-307.
114. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998;13:325-49.
115. Zehnder D, Bland R, Williams MC, et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:888-94.
116. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:5382-90.
117. Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, et al. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 2000;120:139-46.
118. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-95.
119. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:685-704.
120. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 1999;277:F157-75.
121. Mizwicki MT, Keidel D, Bula CM, et al. Identification of an alternative ligand-binding pocket in the nuclear vitamin D receptor and its functional importance in 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:12876-81.
122. Khanal RC, Nemere I. The ERp57/GRp58/1,25D₃-MARRS receptor: multiple functional roles in diverse cell systems. *Curr Med Chem* 2007;14:1087-93.
123. Nemere I, Safford SE, Rohe B, DeSouza MM, Farach-Carson MC. Identification and characterization of 1,25D₃-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D₃-MARRS) binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:281-5.

124. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-51.
125. O'Kelly J, Hisatake J, Hisatake Y, Bishop J, Norman A, Koeffler HP. Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest* 2002;109:1091-9.
126. May E, Asadullah K, Zugel U. Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3:377-93.
127. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1717S-20S.
128. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:23-33.
129. Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol* 2003;17:2386-92.
130. Wachtershauer A, Stein J. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr* 2000;39:164-71.
131. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:104-19.
132. Bingham SA, Day NE, Luben R, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003;361:1496-501.
133. Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 1997;427:123-34.
134. Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 1994;35:S35-8.

135. Cuff M, Dyer J, Jones M, Shirazi-Beechey S. The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis. *Gastroenterology* 2005;128:676-86.
136. Gupta N, Martin PM, Prasad PD, Ganapathy V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sci* 2006;78:2419-25.
137. Stein J, Zores M, Schroder O. Short-chain fatty acid (SCFA) uptake into Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier mediated transport mechanism. *Eur J Nutr* 2000;39:121-5.
138. McNeil NI, Cummings JH, James WP. Rectal absorption of short chain fatty acids in the absence of chloride. *Gut* 1979;20:400-3.
139. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987;28:1221-7.
140. Scheppach W, Weiler F. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:563-7.
141. Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *The Journal of nutrition* 2002;132:1012-7.
142. Comalada M, Bailon E, de Haro O, et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:487-97.
143. McBain JA, Eastman A, Nobel CS, Mueller GC. Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1357-68.
144. Whitehead RH, Young GP, Bhathal PS. Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). *Gut* 1986;27:1457-63.
145. Gaschott T, Stein J. Short-chain fatty acids and colon cancer cells: the vitamin D receptor--butyrate connection. *Recent Results Cancer Res* 2003;164:247-57.

146. Gaschott T, Werz O, Steinmeyer A, Steinhilber D, Stein J. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is mediated by vitamin D receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 2001;288:690-6.
147. Csordas A. Butyrate, aspirin and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996;5:221-31.
148. Daly K, Shirazi-Beechey SP. Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol* 2006;25:49-62.
149. Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* 1977;268:462-4.
150. de Haan JB, Gevers W, Parker MI. Effects of sodium butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts. *Cancer Res* 1986;46:713-6.
151. Boffa LC, Gruss RJ, Allfrey VG. Manifold effects of sodium butyrate on nuclear function. Selective and reversible inhibition of phosphorylation of histones H1 and H2A and impaired methylation of lysine and arginine residues in nuclear protein fractions. *J Biol Chem* 1981;256:9612-21.
152. Luhrs H, Hock R, Schaubert J, et al. Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells. *International journal of cancer* 2002;97:567-73.
153. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997;389:349-52.
154. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403:41-5.
155. Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* 1978;253:3364-6.
156. Sealy L, Chalkley R. The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* 1978;14:115-21.
157. Raqib R, Sarker P, Bergman P, et al. Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9178-83.

158. Ruemmele F, Ruemmele C, Levy E, Seidman E. [Molecular mechanisms regulating intestinal epithelial cell turnover by nutrients]. *Gastroenterol Clin Biol* 1999;23:47-55.
159. Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Ziegler TR, Wang XD. The gut: a central organ after surgical stress. *Surgery* 1988;104:917-23.
160. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-9.
161. van Santvoort HC, Besselink MG, Timmerman HM, van Minnen LP, Akkermans LM, Gooszen HG. Probiotics in surgery. *Surgery* 2008;143:1-7.
162. Wilcox MH. Gastrointestinal disorders and the critically ill. Clostridium difficile infection and pseudomembranous colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:475-93.
163. Putensen C, Wrigge H, Hering R. The effects of mechanical ventilation on the gut and abdomen. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:160-5.
164. Ockenga J. Theorie und Praxis der enteralen Ernährung. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2003;40:720-34.
165. Bergstrom J, Furst P, Noree LO, Vinnars E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol* 1974;36:693-7.
166. Newsholme P, Curi R, Pithon Curi TC, Murphy CJ, Garcia C, Pires de Melo M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. *J Nutr Biochem* 1999;10:316-24.
167. Ziegler TR, Bye RL, Persinger RL, Young LS, Antin JH, Wilmore DW. Effects of glutamine supplementation on circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am J Med Sci* 1998;315:4-10.
168. van der Hulst RR, von Meyenfeldt MF, Tiebosch A, Buurman WA, Soeters PB. Glutamine and intestinal immune cells in humans. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1997;21:310-5.
169. Windmueller HG, Spaeth AE. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem* 1974;249:5070-9.

170. Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic Mukosa in man. *Gut* 1980;21:793-8.
171. Quan ZF, Yang C, Li N, Li JS. Effect of glutamine on change in early postoperative intestinal permeability and its relation to systemic inflammatory response. *World J Gastroenterol* 2004;10:1992-4.
172. Ulusoy H, Usul H, Aydin S, et al. Effects of immunonutrition on intestinal Mukosal apoptosis, Mukosal atrophy, and bacterial translocation in head injured rats. *J Clin Neurosci* 2003;10:596-601.
173. Belmonte L, Coeffier M, Le Pessot F, et al. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World J Gastroenterol* 2007;13:2833-40.
174. Conley BA, Egorin MJ, Tait N, et al. Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 1998;4:629-34.
175. Newmark HL, Lupton JR, Young CW. Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett* 1994;78:1-5.
176. Senkal M, Dormann A, Stehle P, Shang E, Suchner U. Survey on structure and performance of nutrition-support teams in Germany. *Clin Nutr* 2002;21:329-35.
177. Senkal M, Haaker R, Deska T, et al. Early enteral gut feeding with conditionally indispensable pharmaconutrients is metabolically safe and is well tolerated in postoperative cancer patients--a pilot study. *Clin Nutr* 2004;23:1193-8.
178. Schroeder J, Alteheld B, Stehle P, Cayeux MC, Chiolero RL, Berger MM. Safety and intestinal tolerance of high-dose enteral antioxidants and glutamine peptides after upper gastrointestinal surgery. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:307-10.
179. Scheppach W. Intestamin and acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2003;22:32.
180. Heyland DK, Dhaliwalm R, Day A, Drover J, Cote H, Wischmeyer P. Optimizing the dose of glutamine dipeptides and antioxidants in critically ill patients: a phase I dose-finding study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007;31:109-18.
181. Beale RJ, Sherry T, Lei K, et al. Early enteral supplementation with key pharmaconutrients improves Sequential Organ Failure Assessment score in critically ill

patients with sepsis: outcome of a randomized, controlled, double-blind trial. *Crit Care Med* 2008;36:131-44.

182. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International journal of cancer* 1976;17:565-77.

183. Fogh J. *Human Tumor Cells In Vitro* New York: Plenum Press; 1975;115-159.

184. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1976;36:4562-9.

185. Dharmasathaphorn K, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD, Masui H. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol* 1984;246:G204-8.

186. Menzel T, Melcher R, Koehler S, et al. Establishment of a colonic adenoma cell line (GEKI-2): spectral karyotype analysis and functional characterization. *International journal of colorectal disease* 2004;19:12-7.

187. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25:386-401.

188. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.

189. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:61-92.

190. Gustafsson BE. The physiological importance of the colonic microflora. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1982;77:117-31.

191. Wiren M, Magnusson KE, Larsson J. The role of glutamine, serum and energy factors in growth of enterocyte-like cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1331-6.

192. Augeron C, Laboisie CL. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res* 1984;44:3961-9.

193. Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol* 2007;23:241-56.
194. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173:2909-12.
195. Harper KD, Iozzo RV, Haddad JG. Receptors for and bioresponses to 1,25-dihydroxyvitamin D in a human colon carcinoma cell line (HT-29). *Metabolism* 1989;38:1062-9.
196. Shabahang M, Buras RR, Davoodi F, Schumaker LM, Nauta RJ, Evans SR. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptor as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition. *Cancer Res* 1993;53:3712-8.
197. Vandewalle B, Wattez N, Lefebvre J. Effects of vitamin D₃ derivatives on growth, differentiation and apoptosis in tumoral colonic HT 29 cells: possible implication of intracellular calcium. *Cancer Lett* 1995;97:99-106.
198. Diaz GD, Paraskeva C, Thomas MG, Binderup L, Hague A. Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D₃ and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res* 2000;60:2304-12.
199. Weber G, Heilborn JD, Chamorro Jimenez CI, Hammarsjo A, Torma H, Stahle M. Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. *The Journal of investigative dermatology* 2005;124:1080-2.
200. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1:1-13.
201. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 2005;17:1-14.
202. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-45.

203. Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 2003;171:6820-6.
204. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-3.
205. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007;117:803-11.
206. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* 2006;36:361-70.
207. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *Faseb J* 2001;15:2579-85.
208. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
209. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007;128:707-19.
210. Kida Y, Shimizu T, Kuwano K. Sodium butyrate up-regulates cathelicidin gene expression via activator protein-1 and histone acetylation at the promoter region in a human lung epithelial cell line, EBC-1. *Molecular immunology* 2006;43:1972-81.
211. Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* 1988;7:1395-402.
212. Fimognari C, Hrelia P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutat Res* 2007;635:90-104.
213. Schwab M, Reynders V, Loitsch S, Steinhilber D, Schroder O, Stein J. The dietary histone deacetylase inhibitor sulforaphane induces human beta-defensin-2 in intestinal epithelial cells. *Immunology* 2008.
214. Bikle D, Teichert A, Hawker N, Xie Z, Oda Y. Sequential regulation of keratinocyte differentiation by 1,25(OH)2D3, VDR, and its coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:396-404.

215. Leo C, Chen JD. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 2000;245:1-11.
216. Schaubert J, Oda Y, Buchau AS, et al. Histone Acetylation in Keratinocytes Enables Control of the Expression of Cathelicidin and CD14 by 1,25-Dihydroxyvitamin D(3). *The Journal of investigative dermatology* 2007.
217. Gombart AF, O'Kelly J, Saito T, Koeffler HP. Regulation of the CAMP gene by 1,25(OH)2D3 in various tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:552-7.
218. Buchau AS, Schaubert J, Hultsch T, Stuetz A, Gallo RL. Pimecrolimus Enhances TLR2/6-Induced Expression of Antimicrobial Peptides in Keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2008.
219. Pestonjamas VK, Huttner KH, Gallo RL. Processing site and gene structure for the murine antimicrobial peptide CRAMP. *Peptides* 2001;22:1643-50.
220. Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG. Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2006;11:112-7.
221. Gaschott T, Steinhilber D, Milovic V, Stein J. Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. *The Journal of nutrition* 2001;131:1839-43.
222. Edelman MJ, Bauer K, Khanwani S, et al. Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:439-44.
223. Newmark HL, Young CW. Butyrate and phenylacetate as differentiating agents: practical problems and opportunities. *J Cell Biochem Suppl* 1995;22:247-53.
224. Planchon P, Pouillart P, Ronco G, Villa P, Pieri F. Differential elimination of synthetic butyric triglycerides in vivo: a pharmacokinetic study. *J Pharm Sci* 1993;82:1046-8.
225. Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA, Basson MD. Glutamine modulates phenotype and stimulates proliferation in human colon cancer cell lines. *Cancer Res* 1994;54:5974-80.

226. Spittler A, Oehler R, Goetzinger P, et al. Low glutamine concentrations induce phenotypical and functional differentiation of U937 myelomonocytic cells. *The Journal of nutrition* 1997;127:2151-7.
227. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, et al. New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immunol* 2005;35:1886-95.
228. Daniel C, Schroder O, Zahn N, Gaschott T, Steinhilber D, Stein JM. The TGFbeta/Smad 3-signaling pathway is involved in butyrate-mediated vitamin D receptor (VDR)-expression. *J Cell Biochem* 2007.
229. Gaschott T, Maassen CU, Stein J. Tributyrin, a butyrate precursor, impairs growth and induces apoptosis and differentiation in pancreatic cancer cells. *Anticancer research* 2001;21:2815-9.
230. Schroder CP, Maurer HR. Tributyrin-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 2002;20:195-200.
231. Chen ZX, Breitman TR. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. *Cancer Res* 1994;54:3494-9.
232. Schroder C, Eckert K, Maurer HR. Tributyrin induces growth inhibitory and differentiating effects on HT-29 colon cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 1998;13:1335-40.
233. Rocchi P, Tonelli R, Camerin C, et al. p21Waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. *Oncol Rep* 2005;13:1139-44.
234. Archer SY, Johnson J, Kim HJ, et al. The histone deacetylase inhibitor butyrate downregulates cyclin B1 gene expression via a p21/WAF-1-dependent mechanism in human colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G696-703.
235. Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 2000;1471:M43-56.
236. Oda Y, Ishikawa MH, Hawker NP, Yun QC, Bikle DD. Differential role of two VDR coactivators, DRIP205 and SRC-3, in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:776-80.

237. Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem* 2004;92:436-44.
238. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 1996;10:142-53.
239. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* 2004;26:21-8.
240. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-88.
241. Tirona RG, Kim RB. Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J Pharm Sci* 2005;94:1169-86.
242. Schwab M, Reynders V, Shastri Y, Loitsch S, Stein J, Schroder O. Role of nuclear hormone receptors in butyrate-mediated up-regulation of the antimicrobial peptide cathelicidin in epithelial colorectal cells. *Molecular immunology* 2007;44:2107-14.
243. Daniel C, Schroder O, Zahn N, Gaschott T, Stein J. p38 MAPK signaling pathway is involved in butyrate-induced vitamin D receptor expression. *Biochemical and biophysical research communications* 2004;324:1220-6.
244. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996;74:589-607.
245. Moon SK, Lee HY, Li JD, et al. Activation of a Src-dependent Raf-MEK1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1alpha-induced upregulation of beta-defensin 2 in human middle ear epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1590:41-51.
246. Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8822-8.
247. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci* 2005;40:123-32.
248. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:457-66.

249. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1998;42:2206-14.
250. Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, et al. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infection and immunity* 2000;68:2748-55.
251. Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res* 2000;49:73-9.
252. Vogel HJ, Bonner DM. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* 1956;218:97-106.
253. Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of leukocyte biology* 2005;77:451-9.
254. Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect* 2002;4:361-72.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: schematische Darstellung des hCAP 18.....	2
Abb. 2: Vitamin D ₃ – Synthese, Metabolisierung und Abbau.....	10
Abb. 3: RT-PCR.....	32
Abb. 4: C _T -Wert.....	33
Abb. 5: <i>camp</i> -Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH) ₂ D ₃	36
Abb. 6: <i>camp</i> -Expression in SW 480 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH) ₂ D ₃	37
Abb. 7: <i>camp</i> -Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH) ₂ D ₃	38
Abb. 8: <i>camp</i> -Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH) ₂ D ₃	39
Abb. 9: <i>camp</i> -Expression in U 937 Zellen nach Inkubation mit 1,25(OH) ₂ D ₃	40
Abb. 10: <i>camp</i> -Expression in Kolonzellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D ₃	41
Abb. 11: <i>camp</i> -Expression in Kolonzellen nach Inkubation mit 4 mM Butyrat	42
Abb. 12: <i>camp</i> -Expression in GEKI 02 nach Koinkubation mit 25 nM 1,25(OH) ₂ D ₃ und 4 mM Butyrat.....	44
Abb. 13: A: <i>camp</i> -Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D ₃ und 4 mM Butyrat. B: <i>camp</i> -Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D ₃ und 4 mM Butyrat C: <i>camp</i> -Expression in SW 480 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D ₃ und 4 mM Butyrat	46
Abb. 14: <i>camp</i> -Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit Intestamin®	49
Abb. 15: <i>camp</i> -Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit Intestamin®.	50
Abb. 16: <i>camp</i> -Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit Intestamin®.	51
Abb. 17: <i>camp</i> -Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit Intestamin®.	52
Abb. 18: <i>camp</i> -Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin® und 4mM Butyrat	53
Abb. 19: A: <i>camp</i> -Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D ₃ und 10 µM U0126. B: <i>camp</i> -Expression in SW 480 Zellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D ₃ und 10 µM U0126.	55
Abb. 20: <i>camp</i> -Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin® und 10 µM U0126.	56
Abb. 21: <i>camp</i> -Expression in T 84 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin® und 10 µM U0126.	57
Abb. 22: <i>camp</i> -Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin® und 10 µM U0126..	58
Abb. 23: <i>camp</i> -Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin® und 10 µM U0126.	59
Abb. 24: A: <i>camp</i> -Expression in HT 29 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin®, 4 mM Butyrat und 10 µM U0126; B: <i>camp</i> -Expression in SW 620 Zellen nach Inkubation mit 10%	

Intestamin [®] , 4 mM Butyrat und 10 µM U0126; C: <i>camp</i> -Expression in GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin [®] , 4 mM Butyrat und 10 µM U0126.....	62
Abb. 25: Überlebensassay von <i>E.coli</i> gegenüber stimulierten HT 29 Zellen	63

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: durchschnittlicher Inhalt pro 500 ml Intestamin® (Fresenius Kabi)	25
Tabelle 2: PCR-Zyklusabfolge.....	31
Tabelle 3: -fache Genexpression in Kolonepithelzellen in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen nach Inkubation mit 25 nM Vitamin D₃, 4 mM Butyrat und 25 nM Vitamin D₃ plus 4 mM Butyrat	48
Tabelle 4: -fache <i>camp</i>-Expression in HT 29, SW 620 und GEKI 02 Zellen nach Inkubation mit 10% Intestamin®, 4 mM Butyrat und 10 µM U0126	60

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Untersuchungen im Rahmen meiner Promotion in seinem Labor durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. M. Scheurlen, Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates. Frau Prof. Dr. rer. nat. AM. Waaga-Gasser danke ich für die freundliche Übernahme der mündlichen Prüfung.

Für die aufmerksame, motivierende und fachkundige Betreuung und die Anregungen im praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit danke ich herzlich meiner Betreuerin Dr. rer. nat. D. Rogoll. Unsere Zusammenarbeit war für mich und meine Arbeit überaus förderlich und gewinnbringend.

Mein Dank gilt ferner den Kollegen, die in verschiedenster Weise an der Arbeit mitgewirkt haben. Ich danke Frau K. Engelmann-Pilger und Dr. J. Schaub. Weiterhin will ich Frau A. Volk danken, für ihre Mühe, mich in die Arbeit im Labor einzuführen, und für ihre hilfreichen Anleitungen von der Isolierung der RNA bis zur Etablierung der RT-PCR. Frau E. Kelber und Frau D. Kuhn danke ich für ihre Unterstützung bei der Zellkultur. Bei den Mitarbeiterinnen des Gastroenterologischen Labors Frau K. Backhaus, Frau G. Dusel und Frau I. Holub bedanke ich mich ihre Unterstützung.

Mein Dank gebührt der Firma Fresenius Kabi, die freundlicherweise Intestamin[®] zur Verfügung stellte.

Dem Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. danke ich, mich ideell und finanziell während meines Studiums begleitet und unterstützt zu haben. Das Studienwerk und der intensive interdisziplinäre Austausch mit den Stipendiaten haben mich geprägt.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und meinen Freund Julius für die Unterstützung während dieser Arbeit und darüber hinaus. Für diesen Rückhalt bin ich sehr dankbar.