

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

Expression des antimikrobiellen Cathelicidins hCAP/LL37 in der Colonmukosa bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Daniel Rieger
aus Nürnberg

Würzburg, Dezember 2009

Referent: Professor Dr. med. Wolfgang Scheppach

Koreferent: Professor Dr. med. Michael Scheurlen

mündlicher Prüfer: Professor Dr. med. Justus Müller

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

30. Juni 2010

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	(S. 1)
1.1 Antimikrobielle Peptide	(S. 1)
1.1.1 Defensine	(S. 2)
1.1.2 Cathelicidine	(S. 3)
1.2 AMP und GI-Trakt	(S. 6)
1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	(S. 7)
2. Material und Methoden	(S. 13)
2.1 Material	(S. 13)
2.1.1 Geräte	(S. 13)
2.1.2 Oligonukleotide und Primer	(S. 13)
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	(S. 14)
2.2 Methoden	(S. 15)
2.2.1 RNA-Extraktion	(S. 15)
2.2.2 RNA Aufreinigung und RNase-free DNase- Behandlung	(S. 16)
2.2.3 cDNA-Synthese	(S. 17)
2.2.4 Semiquantitative Real-Time-PCR	(S. 17)
2.2.5 Immunhistochemische Färbung	(S. 22)
2.3. Statistische Analysen	(S. 24)
3. Ergebnisse	(S. 25)
3.1 Vergleich der CAMP-Genexpression in Colonmukosa bei Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten	(S. 26)
3.2 Vergleich der CAMP-Genexpression bei Patienten mit Morbus Crohn in Biopsien aus nicht entzündeter und entzündeter Ileummukosa	(S. 29)
3.3 Analyse der Cathelicidin-Expression bei NOD2-Mutation	(S. 29)

3.4 Analyse der CD4+ Lymphozytenzahl in entzündeten Morbus Crohn-Biopsien	(S. 31)
3.5 Cathelicidin-Peptid-Expression in der Colonmukosa von Patienten mit CED mittels Immunhistochemie	(S. 33)
4. Diskussion	(S. 35)
5. Zusammenfassung	(S. 42)
6. Abkürzungsverzeichnis	(S. 43)
7. Referenzen	(S. 45)
8. Abbildungsverzeichnis	(S. 52)

1. Einleitung

1.1 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind natürlich vorkommende Antibiotika, welche von vielen Spezies wie Pflanzen, Bakterien, Insekten und Wirbeltieren als Teil des angeborenen Immunsystems eingesetzt werden. [1] Sie sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems und haben sowohl eine direkt antimikrobielle Wirkung als auch Funktionen als Aktivator und Modulator des erworbenen Immunsystems. Somit bilden sie ein Bindeglied zwischen diesen beiden Systemen. [2-4]

Endogene antimikrobielle Peptide stellen einen schnellen, potenten und energieeffizienten Abwehrmechanismus mit breitem Spektrum dar, das sich von gram-positiven und gram-negativen Bakterien über Pilze und Protozoen bis hin zu verschiedenen Viren erstreckt. [1, 2] Die bakterizide Konzentration *in vitro* liegt dabei mit 1-30 µg/ml im Bereich synthetischer Antibiotika. [5] Resistenzentwicklungen sind selten, allerdings wurden resistente Stämme von *Enterokokkus faecalis* und *Staphylococcus epidermidis* beschrieben. [1, 6] Mechanismen der Resistenzentwicklung umfassen Effluxpumpensysteme, mit denen antimikrobielle Peptide von Bakterien entfernt werden, oder Veränderungen der Zellwandbestandteile. [7] Es besteht ein Synergismus mit anderen Abwehrmolekülen wie Lysozym und Laktoferrin. Das Vorkommen von AMPs in Neutrophilen und an Epithelien betont ihre besondere Rolle bei der lokalen antimikrobiellen Abwehr. [1] Durch den bei neutralem pH-Wert kationischen Charakter dieser Peptide können sie sich an die anionische Zellmembran der Mikroorganismen anlagern und dort Poren bilden, was schließlich zur Lyse der betreffenden Bakterienzelle führt. [2, 8] Die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Zellmembranen bedingt die partielle Selektivität gegenüber Prokaryonten. Andere Mechanismen auf DNA- bzw. RNA-Ebene sind für AMP anderer Säugetierspezies beschrieben. [8] Mit steigender Konzentration der AMP ergibt sich jedoch auch eine Toxizität gegenüber eukaryontischen Zellen (Konzentrationen jenseits der dreifachen

antimikrobiellen Konzentration wirken zytotoxisch auf eukaryontische Zellen). [8] Die antimikrobielle Aktivität ist außerdem abhängig vom pH-Wert und der Elektrolytkonzentration, die wiederum die räumliche Konfiguration der AMP bedingt. Eine α -helikale Konfiguration erhöht die antimikrobielle Aktivität. [8, 9] Allerdings konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die antimikrobielle Wirkung der AMP von physiologischer Salzlösung und Serum inaktiviert werden kann. Dies wirft die Frage auf, ob die primäre physiologische Funktion dieser Peptide die direkte Eliminierung der Mikroorganismen ist oder sie nicht primär als Modulatoren und Induktoren der Immunantwort gesehen werden müssen. So wurden ihre Fähigkeiten Chemokinausschüttung zu fördern, Chemotaxis bei Makropagen, Neutrophilen und T-Lymphozyten auszulösen, die Histaminfreisetzung aus Mastzellen zu erhöhen und Differenzierung von Dendritischen Zellen zu modulieren auch unter physiologischen Salzkonzentrationen nachgewiesen. [2, 5, 10]

AMP werden als Prepropeptid synthetisiert. [2] Das Prosegment ist meist anionisch und hat neben der korrekten Faltung des C-Terminus wahrscheinlich noch andere Aufgaben. Zu diesen gehören intrazellulärer Transport sowie die Neutralisation des reifen Peptides. Während späterer intrazellulärer Prozessierungsschritte oder nach Sekretion wird das Propeptid abgespalten. [2] Es wurden verschiedene Familien der AMP mit Unterschieden in Größe, Aminosäuresequenz, Struktur und Wirkung auf Mikroorganismen beschrieben. [2] Die beiden wichtigsten Familien der AMP stellen die Cathelicidine und Defensine dar.

1.1.1 Defensine

Defensine sind kationische, argininreiche, nichtglycosylierte Peptide mit einer Masse von 3,5 – 4,5 kDa und drei charakteristischen, zwischen zwei Cystein-Molekülen ausgebildeten Disulfidbrücken. Nach der Art der Ausbildung dieser Disulfidbrücken und der molekularen Gesamtstruktur kann man die Defensine in α -, β - und θ - Defensine einteilen. Die kodierenden Gene der α - und β -Defensine liegen auf einem Cluster auf dem Chromosom 8q23. [2] α - Defensine

weisen ein dreisträngiges β -Faltblatt mit einer β -Haarnadel, welche kationische Aminosäuren enthält, auf. Es wurden bislang 6 humane α - Defensine beschrieben, von denen 4 als humane neutrophile Peptide 1-4 (HNP 1-4) in Granulozyten vorkommen und dort ein Schlüsselprotein in der Elimination phagozytierter Mikroorganismen darstellen.

Die zwei anderen α - Defensine (humanes Defensin 5 und 6) finden sich vor allem in den Paneth- Körnerzellen und in Epithelien der Haut, der Lunge und des Gastrointestinal- und Urogenital-Trakts. Laut Wilson et al. werden das humane Defensin 5 und 6 durch eine epithelständige Metalloprotease (Matrilysin (MMP7)) im Kolon aktiviert. [2] Matrilysin-Knockout-Mäuse zeigen daher eine erhöhte Infektanfälligkeit gegenüber niedrigen Dosen *Salmonella typhimurium* und längere Krankheitsverläufe bei Infektion mit *EPEC* - Stämmen verglichen mit Wildtyp-Mäusen. [11]

β - Defensine weisen ebenfalls drei Disulfidbrücken auf, welche aber verschieden positioniert zu einer anderen räumlichen Konfiguration führen. Bisher sind vier humane β - Defensine (HBD 1-4) beschrieben, von denen das HBD1 konstitutiv vom Epithel exprimiert wird. HBD2, HBD3 und HBD4 können durch Entzündungsmediatoren wie IL1, IL6 und TNF α sowie durch LPS in den Epithelien induziert werden. [2, 11-15]

1.1.2 Cathelicidine

Cathelicidine sind eine Familie antibiotisch wirkender Peptide, die nur in Säugetieren vorkommen. [1] Die meisten Cathelicidine sind in der spezifischen Granula der Neutrophilen oder Makrophagen gespeichert und tragen dort zur nicht oxidativen Abtötung von Mikroorganismen bei. [8] In den letzten Jahren wurden die Cathelicidine in Epithelzellen entdeckt, was ihre Rolle in der Erregerabwehr an Körperoberflächen unterstreicht. [8, 16, 17]

Cathelicidine zeigen eine hochgradig konservierte N-terminale Signalsequenz und Pro-Region, das so genannte Cathelin. Moleküle mit sehr ähnlichen Sequenzen wurden in vielen Spezies gefunden. [8] Diese evolutionäre Konservierung der Cathelin- Region legt die Entwicklung aus einem

gemeinsamen Vorläufergen mit spezifischer biologischer Funktion nahe. Diese besteht wahrscheinlich unter anderem in der Sicherstellung der richtigen Sekundär- und Tertiärstruktur des reifen antimikrobiellen C-terminalen Peptids. [1, 8] Kürzlich wurde auch für das Cathelinpeptid antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. Auch kann es Proteasen inhibieren und somit das prozessierte LL37 vor dessen Abbau schützen. [18]

Am C-terminalen Ende, welches das eigentliche wirksame Peptid mit einer Größe von 12-100 Aminosäuren darstellt, zeigen die Cathelicidine jedoch von Spezies zu Spezies hohe Variabilität in Länge, Sequenz, Struktur und biologischer Funktion. [1, 2, 8, 19] Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Cathelicidine wurde für einige Moleküle verschiedener Spezies untersucht und reicht vom zufälligen Knäuel bis zu einer geordneten überwiegend α -helikalen Form. [8]

Das einzige humane Cathelicidin LL37/hCAP-18 wurde erstmals aus humanen Knochenmarkszellen isoliert, konnte aber auch in entzündeter Haut [17], in Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten [3], im Hoden, in der Lunge [16] und im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden. [1, 8] Das Gen, welches LL37 codiert, wurde CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide) genannt und besteht aus 4 Exons, welche auf Chromosom 4 liegen. Die ersten drei Exons codieren dabei die Signal- und Cathelinsequenz, die bei allen Säugetierspezies gleich ist, das vierte das jeweilige aktive Peptid. [8] (Abbildung 1) Spezifische Bindungsregionen für Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion des CAMP wie NF κ B, NF-IL6, „akute phase response factor“, activator proteine 4 und CCAAT/enhancer- binding proteine (C/EBP) [1] vermitteln die Induktion dieses Gens im Zuge der Entzündungsreaktion. [8, 17]

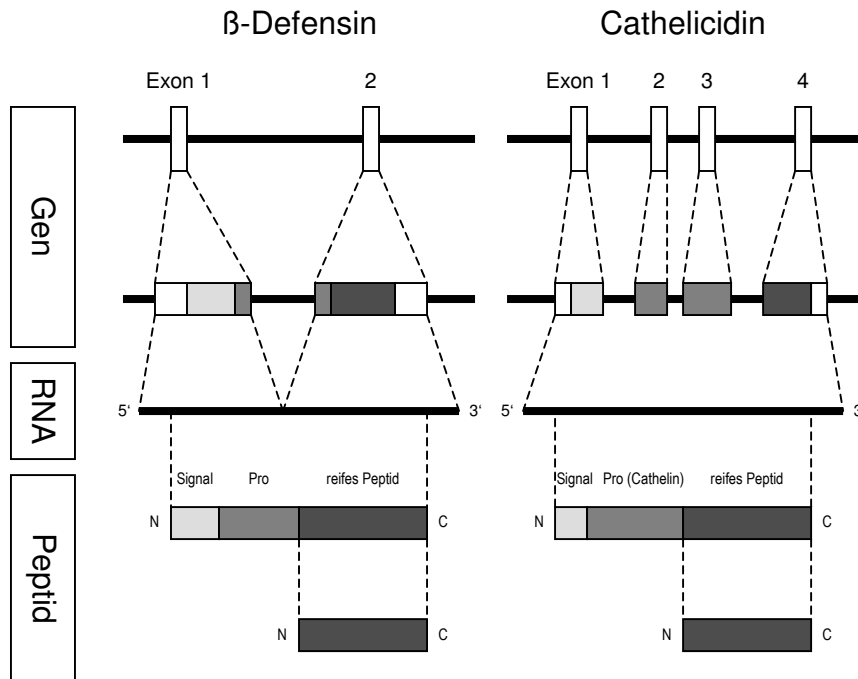


Abb. 1: Vom Gen zum fertigen Peptid. Die Gemeinsamkeiten der AMP anhand von Defensinen und Cathelicidinen. Das einzige humane Cathelicidin wird aus dem CAMP-Gen, bestehend aus 4 Exons, translatiert. Das entstandene Peptid hCAP 18 (104 AS) besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, der Cathelin Prosequenz und LL37 (37 AS), dem aktiven Cathelicidin. (Abbildung nach Bals „Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection“ [2])

LL37 wird als Propeptid hCAP-18, bestehend aus 140 Aminosäuren (AS), gespeichert oder sezerniert und extrazellulär oder in der Phagozytosevakuole durch Proteinase 3 oder Elastase zwischen ALA (103) und Leu (104) in das Cathelin und das aktive Cathelicidin LL37 gespalten. [1, 8, 20-23] LL-37 besteht aus 37 Aminosäuren, beginnend mit zwei Leucin, besitzt eine positive Nettoladung, ein hochgradig hydrophiles N-terminales Ende und eine α -helikale Struktur. [1]

Neben der eigentlichen antimikrobiellen Aktivität besitzen Cathelicidine einige andere Funktionen. So können sie zum Beispiel LPS binden und neutralisieren und somit einem Endotoxinschock vorbeugen. Dies konnte in einem Mausmodell mit signifikant verminderter Mortalität und Morbidität an Pneumonie und Endotoxinschock bei LL37 -Überexpression gezeigt werden. [8, 11] Weiterhin wirkt LL37 chemotaktisch auf Monozyten, Neutrophile und CD4-positive T-Zellen und stimuliert Mastzellen zur Degranulation nach Aktivierung

des „formyl peptide rezeptor like 1“ (FPRL1-) Rezeptors. [8, 10, 18, 24] Ebenso steigert LL37/hCAP18 als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr die Differenzierung und Antigenpräsentation von dendritischen Zellen und bewirkt somit eine verlängerte und stärkere Th1-Antwort. [4] Auch wurden Erhöhungen der LL37-Expression in verletzten und pathologisch veränderten Hautarealen wie bei Lupus erythematoses, Psoriasis und Nickel-Kontaktallergie beobachtet. [1, 17] Des Weiteren konnten fördernde Effekte auf die Wundheilung und Angiogenese beobachtet werden. In entzündlichen Arealen von Patienten mit atopischer Dermatitis wurden dagegen verringerte LL37- und HBD2-Spiegel gefunden, was die erhöhte Anfälligkeit dieser Patienten für Hautinfektionen erklären könnte. [5, 25, 26]

1.2 AMP und GI-Trakt

Der Gastrointestinaltrakt ist einzigartig in seiner Eigenschaft als größte Grenzfläche des Körpers, die konstant einer hohen Zahl an Mikroorganismen ausgesetzt ist. Hierbei fallen sowohl die oral mit der Nahrung aufgenommene als auch die residente Flora ins Gewicht. Dies setzt eine effiziente antimikrobielle Kontrolle oder Abwehr voraus. Die Wechselwirkungen der residenten Bakterienflora und des Wirtes sind sehr komplex und bisher noch nicht vollkommen erforscht. Die ausgedehnte Expression der AMPs in der Kolonmukosa legt ihre Rolle bei der Stabilisierung der residenten Flora und gleichzeitiger Sicherung der Integrität der Epithelbarriere nahe. Weiterhin tragen sie zur relativen Sterilität einzelner Abschnitte des GI-Traktes bei. [11] Dieses Gleichgewicht zwischen mukosaler Abwehr und Flora ist zum Beispiel bei Shigellen- Infektionen gestört. Shigella-Bakterien haben einen Mechanismus entwickelt die Expression der AMP im Epithel zu reduzieren und dann in die Mukosa einzudringen. [11, 27] Auch konnte eine verminderte Expression von α -Defensinen in Paneth - Zellen nach oraler Infektion von Mäusen mit Wildtyp *Salmonella typhimurium* nachgewiesen werden. Keinen Effekt hatten hier Hitze-inaktivierte Stämme oder andere Bakterien. [11, 28] Weiterhin zeigte eine

andere Studie an transgenen HD-5 in Paneth-Zellen exprimierenden Mäusen verminderte Infektanfälligkeit. [11, 29] Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung mukosaler AMP in der Abwehr gastrointestinaler Infektionen.

Während α -Defensine im GI-Trakt vorwiegend durch Paneth-Körnerzellen im Kryptengrund sezerniert werden, werden die humanen β -Defensine konstitutiv (HBD1) oder induziert (HBD2-4) durch das Epithel des GI-Trakts gebildet. [10, 11, 30] Die induzierbaren humanen β -Defensine können durch Entzündungsmediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL1}\beta$ und Bakterienbestandteile wie LPS induziert werden. [15] Demgegenüber wird das humane Cathelicidin LL37/hCAP-18 überwiegend an den Villi des Ileums oder an der Oberfläche des Colons exprimiert und konnte in den Krypten nicht nachgewiesen werden. In vitro-Experimente zeigten eine Erhöhung der Expression in Colonepithelien nach Inkubation mit differenzierungsinduzierenden Faktoren wie Butyrat. Diese Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad der Epithelzellen und LL37-Expression. Hase et al beobachteten, dass der Differenzierungsgrad der Colonozyten für eine konstitutive LL37-Expression ausschlaggebend und hierfür keine bakterielle Besiedlung notwendig ist. Eine Infektion mit *Salmonella enterica serovar Dublin* und *E. coli* zeigten eine schwächere Induktion. Im Gegensatz zu den humanen β -Defensinen wurde bei LL37/hCAP-18 kein Effekt durch Inkubation mit Entzündungsmediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\alpha$, IL6 , LPS und Interferon γ beobachtet. [11, 31, 32]

1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), sind wiederkehrende, entzündliche Veränderungen des gesamten oder von Teilen des gastrointestinalen Traktes. Trotz großer Fortschritte in der Erforschung beider Erkrankungen ist die Pathogenese noch nicht vollständig geklärt. Es besteht weltweit ein klares Nord-Süd Gefälle, was die Inzidenz der CED betrifft. Dieser Gradient besteht z.B. in Europa zwischen

Skandinavien und Südeuropa. Um dies zu erklären wurde der Begriff der „Hygiene-Hypothese“ geprägt. In weniger entwickelten oder wärmeren südlichen Ländern müssen sich Individuen seit dem frühen Kindesalter sehr viel intensiver mit Bakterien, Parasiten und anderen Krankheitserregern auseinandersetzen als in der „sterilen“ westlichen Welt oder kälteren nördlichen Ländern. Hieraus ergibt sich unter Umständen eine unzureichende Stimulation des Immunsystems im frühen Kindesalter in diesen Gebieten, was für Allergien, Autoimmunerkrankungen und CED disponiert. In den Industrienationen kann eine Verschiebung der Mortalität und Morbidität von akuten GI-Infektionen zu CED und Neoplasien beobachtet werden. [33, 34] Auch wenn sich MC und CU als die beiden wichtigsten Vertreter der CED in wesentlichen Punkten unterscheiden, haben sie doch einige wichtige Gemeinsamkeiten. G. Bouma und W. Strober stellten sieben Prinzipien der Pathogenese der CED auf. [35] Ihnen zufolge besagt das erste Prinzip, dass völlig verschiedene genetische Hintergründe zu denselben klinischen Bildern der intestinalen Entzündung führen. Nach ihrem zweiten Prinzip wird durch den individuellen genetischen Hintergrund die Disposition zur überschießenden intestinalen Entzündungsreaktion bestimmt. So sind zum Beispiel einige IL-10-defiziente Mäuse hochgradig anfällig für eine Colitis, andere sind resistent. [35, 36] Einen weiteren Hinweis auf eine multifaktorielle Vererbung und somit auch für diese ersten beiden Prinzipien gibt die Wiederholungsrate bei eineiigen Zwillingen. Sie beträgt für Morbus Crohn 58% und für Colitis ulcerosa 6-17%, wohingegen sich dizygote Zwillinge sich nicht signifikant von den anderen Geschwistern abheben. [35] Auch konnten mittlerweile drei Gene bestimmt werden, die zur Entwicklung eines Morbus Crohn prädisponieren. Das NOD2/CARD15 Gen auf dem Chromosom 16 codiert für einen zytosolischen Rezeptor für Muramyl-Dipeptid aus bakteriellen Zellwänden. Patienten mit dieser Mutation zeigen häufiger eine ileale fibrostenotische Lokalisation des MC. [33, 34, 37] Erst kürzlich wurden zwei weitere Gene beschrieben, die für Morbus Crohn prädisponieren. OCTN auf Chromosom 5 und DLG5 auf Chromosom 10. Deren Funktion ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. [34]

Zur Ausbildung einer Colitis ist die bakterielle Mikroflora essentiell, was G. Bouma und W. Strober in ihrem dritten Prinzip beschreiben. Mäuse die in einer sterilen Umgebung aufgezogen werden, entwickeln keine Colitis. [35, 38] Auch einige Studien über die Wirksamkeit von Antibiotika in der Therapie der CED sprechen für die Bedeutung der bakteriellen Flora. So wurde unter anderem gezeigt, dass Ciprofloxacin und/oder Metronidazol hilfreich bei der Remissionsinduktion und –aufrechterhaltung sein kann. [39] Bisher konnte aber noch kein einzelner Bakterienstamm als ursächlich für CED identifiziert werden. Allerdings können nicht alle Bakterien *in vitro* kultiviert werden. [40] Auch wenn einige Bakterien als pathogenetisch relevant einzustufen sind, gibt es andere, sogenannte probiotische Bakterien, deren Antigene wahrscheinlich über eine Induktion oder Imitation von Suppressor-Cytokinen wie TGF- β und IL10, zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion führen. [35, 39, 41] Diese Antigene einiger schon von kurz nach der Geburt zur Mikroflora des Darms gehörenden Bakterien finden wahrscheinlich in gewissem Umfang Zugang zum inneren Milieu und werden durch Prozessierung im Thymus nicht länger als fremd erkannt. Dieses Phänomen wird auch orale Toleranz genannt. Dass die orale Toleranz bei Patienten mit CED gestört sein könnte, wurde durch eine *in-vitro* Studie an MC-Patienten hervorgehoben. T-Zellen von MC-Patienten zeigten Proliferation und Produktion von Cytokinen nach Inkubation mit Antigenen der patienteneigenen Bakterienflora, was bei gesunden Patienten nicht beobachtet werden konnte. [35, 42] Auch konnten weniger apoptotische T-Zellen in der Lamina propria nachgewiesen werden. Normalerweise befinden sich mindestens 15% dieser Lymphozyten in Apoptose, was einen Mechanismus zur Toleranzaufrechterhaltung darstellt. [35, 39, 42] Dies führt zu dem vierten Prinzip das besagt, dass eine Entzündung entweder aus einer erhöhten Aktivität der Effektor-T-Zellen oder aus einer verminderten Funktion der Suppressor-T-Zellen entstehen kann. In einem Modell mit Mäusen mit schwerem kombiniertem Immundefekt (SCID) führt eine Transfusion von nativen T-Zellen ohne regulatorische T-Zellen zu einer Entzündungsreaktion in der Mukosa, welche durch gleichzeitige Applikation von regulatorischen T-Zellen verhindert werden konnte. Bei Patienten mit CED konnte gezeigt werden,

dass vermindert CD8+ Suppressor-T-Zellen gebildet werden. Auch wurden mehr reife dendritische Zellen mit costimulatorischen Faktoren (CD40 und CD86) auf der Oberfläche im peripheren Blut von Patienten mit CED gefunden. [35, 39, 43]

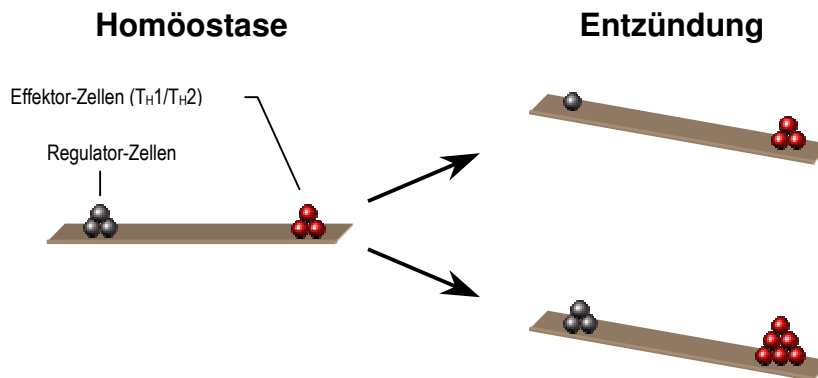


Abb. 2: Wege der Entzündung: Eine überschießende Entzündungsreaktion kann entweder durch einen Überschuss an Entzündungszellen oder durch Fehlen von Suppressorzellen verursacht werden. (Abbildung nach Bouma "The immunological and genetic basis of inflammatory bowle disease" [35])

Das fünfte Prinzip beschreibt zwei mögliche Endstrecken der chronischen Schleimhautentzündung, von denen die eine durch T_H1 -Helfer-Zellen und die andere als T_H2 -Antwort vermittelt wird. Der T_H1 -Weg wird durch die Cytokine IL-12, $INF-\gamma$ und $TNF-\alpha$ vermittelt, der T_H2 -Weg durch IL-4, IL-5 und IL-13. Auch morphologisch unterscheiden sich diese beiden Möglichkeiten grundlegend. Eine experimentell durch TNBS induzierte Colitis geht mit einer Erhöhung der IL-12 Level und einer T_H1 -Helfer Antwort einher. Morphologisch ist diese Art der Entzündung transmural und granulomatös und ähnelt somit dem Morbus Crohn. Außerdem wurde in mehreren *in vivo*-Studien bei MC-Patienten eine IL-12-Überproduktion nachgewiesen. [35, 44] Auch *ex vivo* konnte eine IL-12-Überproduktion durch aus den Läsionen der MC-Patienten isolierten Makrophagen beschrieben werden, wohingegen Makrophagen von CU-Patienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe weniger IL-12 produzierten. [35, 44] Auch aus MC-Patienten isolierte T-Zellen produzierten mehr $INF-\gamma$ und weniger IL-4. Wird die experimentelle Colitis durch Oxalozon induziert, stellt

sich eine T_H2 -Antwort mit erhöhtem IL-13 und IL-4 Level ein. Die Colitis ist eine morphologisch der Colitis ulcerosa ähnelnde eher oberflächliche und destruktive Entzündung mit vielen Neutrophilen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Elimination der NKT-Zellen, die IL13 produzieren, oder Blockade der IL-13-Rezeptoren durch ein Immunglobulin die Ausbildung einer Colitis verhindern kann. [35, 45] Da die T_H2 -Antwort die B-Zellen effektiver stimulieren kann, spricht die Tatsache, dass CU in höherem Maße mit dem Vorhandensein von Autoantikörpern (pANCA, Antitropomyosin) vergesellschaftet ist als MC, für diese Theorie. Des weiteren konnten erhöhte Level, zwar nicht des Leicytokins IL4, aber doch wichtiger Cytokine, IL-5 und IL-13, der T_H2 -Antwort bei Patienten mit CU nachgewiesen werden. [35, 46, 47] Die Datenlage ist hierzu jedoch weniger aussagekräftig. Da IL-4 als Leicytokin nicht signifikant erhöht ist, spricht man auch von einer atypischer T_H2 -Antwort. [34]

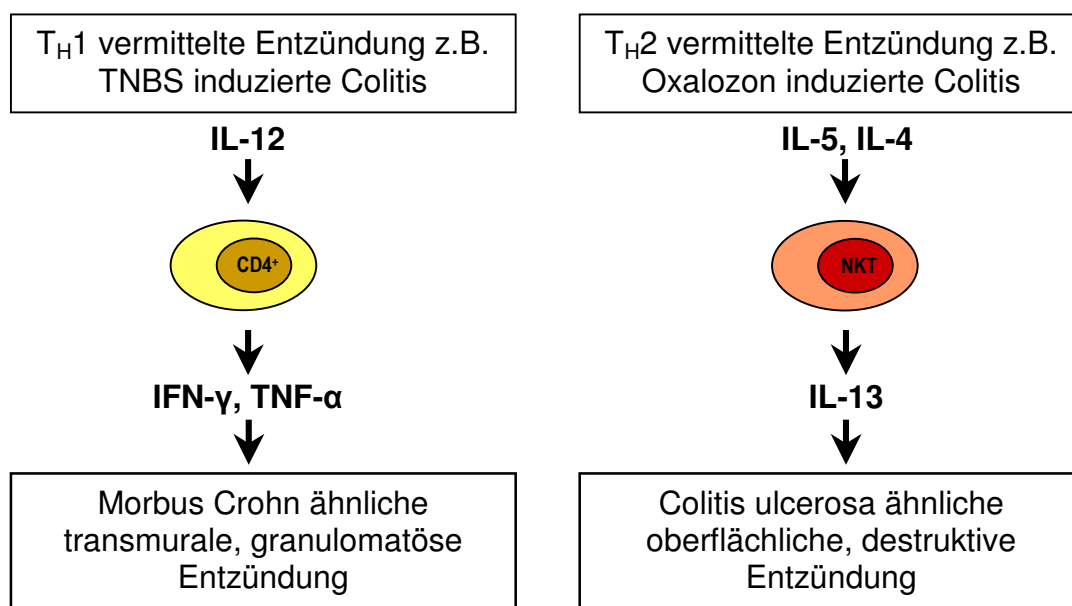


Abb. 3 T_H1 - und T_H2 - vermittelte Colitis. TNBS erzeugt eine Colitis, welche von T_H1 -Helferzellen induziert und durch IL-12 als Leicytokin vermittelt wird. Diese Entzündung ist transmural und ähnelt dem Morbus Crohn. Im Gegensatz dazu induziert Oxalozon eine oberflächliche Entzündung welche der Colitis ulcerosa ähnelt. Diese Entzündung ist durch T_H2 -Helferzellen und IL-4 als Leicytokin vermittelt. (Abbildung nach Bouma "The immunological and genetic basis of inflammatory bowle disease" [35])

Dem Epithel, das durch seine Funktion als Barriere eine räumliche Trennung von potentiell entzündungsinduzierenden Mikroorganismen und den Effektorzellen des Immunsystems gewährleistet, widmen G. Bouma und W. Strober ihr sechstes Prinzip. Die räumliche Trennung ist essentiell, um eine überschießende Stimulation des Immunsystems und somit Schaden am Epithel zu verhindern. Die Effektivität dieser Barriere hängt aber auch maßgeblich von der Fähigkeit des Epithels ab, eindringende Mikroorganismen mittels Toll-like Rezeptors und cytosolischem NOD1/2 zu erkennen und mit der Produktion von AMP, pro- oder antiinflammatorischen Cytokinen zu reagieren. Aber auch die andauernde Kontrolle und Präsentation von Antigenen aus dem Darmlumen durch M-Zellen an die darunter liegenden Zellen in den Payer-Plaques ist wichtig zur Erhaltung der Homöostase. Interessanterweise haften Bakterien der Normalflora schlechter an M-Zellen als potentielle Antigene. Zum Beispiel wird *Vibrio cholerae* schnell endozytotisch aufgenommen und präsentiert, hitzeinaktivierte Bakterien derselben Gattung jedoch nicht. Hinweise auf eine veränderte Interaktion zwischen Epithel und Bakterienflora ergaben sich aus den Beobachtungen von Swidinski et al. Sie fanden bei Patienten mit CED vermehrt adhärente und teilweise invasive Bakterien auf der normalerweise annähernd sterilen Colonschleimhaut. [33, 35, 37, 39, 48]

Das siebente und letzte Prinzip beschäftigt sich mit den Fehlern des angeborenen Immunsystems. So prädisponiert zum Beispiel eine NOD2-Mutation zur Ausbildung des Morbus Crohn im ileocaecalen Übergang. Es konnte gezeigt werden, dass die α -Defensine 5 und 6 bei Patienten mit NOD2-Mutation in entzündeten Ileumbiopsien vermindert exprimiert werden. Im Colon war ein Anstieg der HD5- und HD6- Expression in MC Patienten zu beobachten, welcher jedoch bei Patienten mit NOD2-Mutation fehlte. Im Vergleich von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa konnten sehr viel stärker erhöhte Expressionslevel von HD5 und den induzierbaren β -Defensinen HBD2 und HBD3 bei Colitis ulcerosa nachgewiesen werden. Die Morbus Crohn-Expressionswerte waren nicht oder nur leicht erhöht. [15, 33, 35, 49, 56] Ob ähnliche Zusammenhänge zwischen der Cathelicidinexpression und CED bestehen ist Gegenstand dieser Dissertation.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Zur Analyse wurden Biopsien von 89 Patienten aus entzündeten und nicht entzündeten Darmabschnitten (Ileum n=17, Kolon n=89) von Morbus Crohn- (n=33, mittleres Alter 41,6 Jahre) und Colitis ulcerosa- (n=28, mittleres Alter 40,2 Jahre) Patienten sowie von gesunden Kontrollprobanden (n=28, mittleres Alter 36,6 Jahre) verwendet. Bei den Kontrollpatienten handelte es sich um Patienten ohne Anamnese einer entzündlichen Darmerkrankung, die zur Abklärung einer gastrointestinalen Blutungsquelle oder zur Karzinomvorsorge untersucht wurden. Alle Biopsien wurden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg, Schwerpunkt Gastroenterologie und am Robert-Bosch-Krankenhaus (RBK) Stuttgart während Ileocoloskopien entnommen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg und am RBK Stuttgart geprüft und genehmigt.

2.1.1 Geräte

iCycler®	BioRad Laboratories, Hercules, CA, UAS
GeneAmp® PCR-System 9700	PE Applied Biosystems, Forster City, USA
Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Jung SM 2000R Mikrotom	Leica, Deutschland
IKA-Vibramax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Polytron®, Rotor Stator	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

2.1.2 Oligonukleotide (Primer) und Sonden

GAPDH-KIT	Applied Biosystems, Forster City, USA)
LL37-Forward Primer	5'-TCG GAT GCT AAC CTC TAC CG-3'

LL37-Reverse Primer	5'-GTC TGG GTC CCC ATC CAT-3'
LL37-Sonde	5'-TGT TAT CCT TAT CAC AAC TGA T-3'
CK18-Forward Primer	5'-GAG GCA TCC AGA ACG AGA AGG-3'
CK18- Reverse Primer	5'-TGC TCC CGG ATT TTG CTC TC-3'
CK18-Sonde	5'-CGG TTC TCG GTC TCC AGG CTC CTC AC-3'
CD4-Forward Primer	5'-GTC CCT TTT AGG CAC TTG CTT CT-3'
CD4- Reverse Primer	5'-TCT TTC CCT GAG TGG CTG CT-3'
CD4-Sonde	5'-TGC TGC AAC TGG CGC TCC TCC-3'

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Holland
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Holland
Xylol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formalin 0,1%	Merk, Darmstadt, Deutschland
Aceton	J.T.Baker, Deventer, Holland
Eiweiß-Glycerin	Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH&Co, Köngen/N., Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merk, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe, Deutschland
NaHPO ₄	Merk, Darmstadt, Deutschland
KHPO ₄	Merk, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merk, Darmstadt, Deutschland
Power Block™ Universal Blocking Reagent	Biogenex, San Ramon, CA, USA
LL37 Kaninchenantiserum	PE Applied Biosystems, Forster City, USA
Synthetisches LL37	Panatecs GmbH, Tübingen Germany
Biotin-Streptavidin Detektionssystem	Multilink®, Biogenex, San Ramon, CA, USA
Tris-Hydrochlorid	Merk, Darmstadt, Deutschland
DAB	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Mayer's Hämalaun	Merk, Darmstadt, Deutschland
Entellan	Merk, Darmstadt, Deutschland
Trifast®	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RNA-Reinigungs Kit	Rneasy, Qiagen, Hilden, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
cDNA-Synthese-Kit	iScript™cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, CA, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix [2x]	PE Applied Biosystems, Forster City, USA
U937 Monozyten	ACC5, DSMZ Braunschweig, Deutschland
T84 Zellen	ATCC (CCL-248)
96-Well Optical Reaktion Plate und Caps	Abgene, Hamburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion

Die gewonnenen Biopsien aus Colon und terminalem Ileum wurden sofort nach Entnahme in 1ml Trifast® (Peqlab, Erlangen, Deutschland) überschichtet und bei -80 °C gelagert. Zur Aufbereitung wurden die Biopsien zunächst manuell und danach mittels Polytron® (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Auf die Zelltrümmer wurden nach 5 minütiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur (RT) pro Probe 200µl Chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gegeben und anschließend 15 Sekunden mittels eines Vortexers gut gemischt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubationszeit bei RT wurden die Proben 5 Minuten bei 13000 U/min und RT zentrifugiert. Die sich dadurch gebildete obere farblose wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 500µl Isopropanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und kräftigem Schütteln präzipitierten die Nukleinsäuren binnen 15 Minuten bei RT. 10 minütiges Zentrifugieren bei 4 °C

und 13000 U/min bewirkte die Ansammlung der Präzipitatstückchen auf dem Boden des Eppendorfgefäßes. Nach Abgießen des Isopropanolüberstandes und zweimaligem Waschen des Präzipitates durch Vortexen und 5 minütiges Zentrifugieren (4°C, 13000U/min) mit 1ml 75% Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Holland) wurde das gewonnene Sediment einige Sekunden an der Luft getrocknet und anschließend in 100µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.2 RNA-Aufreinigung und RNase-free-DNase Behandlung

Die RNA-Aufreinigung wurde mittels eines kommerziellen Kits (Rneasy, Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Der in 100µl DEPC-H₂O gelösten RNA wurden 350µl RLT Puffer (Rneasy, Qiagen) zugefügt, welcher zuvor mit 10µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) pro ml Puffer versetzt worden war. Nach Zugabe von 250µl 100% Ethanol (J.T. Backer, Deventer, Holland) und Invertierung wurde das gesamte Volumen (700µl) der Proben auf eine RNeasy-Säule (aus kommerziellen Kit von Qiagen) gegeben. Anschließend wurde 30 Sekunden bei 10000 U/min und RT zentrifugiert und das Eluat verworfen. Danach wurden 350µl RW1-Puffer (Rneasy, Qiagen) zugegeben, erneut 30 Sekunden bei 10000 U/min und RT zentrifugiert und das Eluat entfernt. Nach Herstellung eines DNase-Mixes (70µl RDD Puffer (Rneasy, Qiagen)) und 10µl DNase-Stammlösung (RNase-free DNase set, Qiagen) pro Probe wurden 80µl dieses Mixes auf die Membran der Säule getropft und circa 30 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde nochmals mit 350µl RW1-Puffer gewaschen und 30 Sekunden bei 10000 U/min und RT zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Zum Waschen wurde RPE-Puffer (Rneasy, Qiagen) mit 4vol% 100% Alkohol aktiviert, 500µl auf die Säule gegeben und anschließend 30 Sekunden bei 10000 U/min und RT zentrifugiert. Das Eluat wurde wiederum entfernt und der Waschschrift wiederholt. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei RT und 13000 U/min wurde der Alkohol aus der Säule entfernt. Daraufhin wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt und die gereinigte RNA mittels 30µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugieren (2min, 13000U/min) aus der Kolonne

gelöst. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) bei 260nm gemessen.

2.2.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte ebenfalls unter Zuhilfenahme eines kommerziellen Kits (iScript™cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, CA, USA). Pro Probe wurden 1µg Gesamt-RNA in 20µl Endlösungsvolumen eingesetzt. Dies entspricht einer RNA-Konzentration von 0,05µg/µl. Hierfür wurden jeweils 4µl 5x iSkript Reaction Mix (Bio-Rad) und 1µl iSkript Reverse Transkriptase (Bio-Rad) zugegeben und die Lösung mit nukleasefreiem Wasser auf 20µl aufgefüllt. Bei jeder cDNA-Synthese wurde eine interne Negativkontrolle mitgeführt, welche aus 15µl nukleasefreiem Wasser, 4µl 5x iScript Reaction Mix (Bio-Rad) und 1µl iScript Reverse Transkriptase (Bio-Rad) bestand. Die reverse Transkription erfolgte im GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen:

5min	25 °C	Aktivierung
30min	42 °C	reverse Transkription
5min	85 °C	Inaktivierung

Die so gewonnene cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei –20 °C aufbewahrt.

2.2.4 Semiquantitative Real-Time PCR

Die semiquantitative Bestimmung der Gen-Expression des Housekeeping-Gens Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) erfolgte mittels eines kommerziellen Kits, welcher keine Pseudogene amplifiziert (PDAR G3 [20x] Applied Biosystems, Forster City, USA), und nach einem etablierten Protokoll. Die Expression von LL37 und des anderen Housekeeping-Gens Cytokeratin 18 (CK18) wurde ebenfalls nach einem etablierten Protokoll durchgeführt. Zur

Analyse der CD4-Expression erstellten wir ein neues Protokoll. Die beiden Housekeeping-Gene konnten parallel bestimmt werden. Die Nucleotidsequenzen der Primer und der Sonden sind unter Punkt 2.1.2 beschrieben. Pro Probe wurden drei Messungen durchgeführt. Der Mastermix für die jeweilige Bestimmung wurde in 15ml Falconi-Röhrchen nach folgenden Schemen angesetzt:

Pro cDNA-Probe	LL37	GAPDH	GAPDH/CK18		CD4
Mastermix TaqMan® Universal PCR Master Mix [2x]	50µl	50µl	50µl		50µl
forward Primer	10µl [3µM]	5µl Human	5µl Human	1µl [30µM]	1µl [10µM]
reverse Primer	10µl [3µM]	GAPDH	GAPDH	1µl [30µM]	1µl [10µM]
Sonde	10µl [2µM]	PDAR G3 [20x]	PDAR G3 [20x]	1µl [20µM]	1µl [20µM]
DEPC-H ₂ O	16µl	41µl	38µl		43µl
Endmenge pro Probe	96µl	96µl	96µl		96µl

Anschließend wurden vom Mastermix je 96µl in 1,2ml Eppendorf-Gefäße gefüllt, 4µl cDNA (LL37 und CD4) bzw. 1µl cDNA und 3µl DEPC-H₂O (GAPDH und CK18) zugegeben und invertiert. Die zur semiquantitativen Analyse notwendige Standardkurve wurde als sechsfach absteigende Verdünnungsreihe aus Mukosa-cDNA bzw. T84-cDNA bekannter Konzentration in 1:4 Verdünnungsschritten zur Bestimmung von GAPDH und CK18 angefertigt. Die Standardkurve für LL37 und CD4 bestand aus U937 Monozyten cDNA (ACC5, DSMZ Braunschweig Deutschland) in 1:2- (LL37) bzw. 1:4- (CD4) Verdünnungsschritten. Auch hiervon wurden 4µl zum Mastermix gegeben. Danach wurden die Eppendorf-Gefäße gevortext und eine Minute bei 6000

U/min und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde die 96-Well Optical Reaktion Plate (ABGene) mit 25µl pro Well befüllt (drei Wells pro Probe um Pipettierungenauigkeiten zu eliminieren) und mit Optical-Caps (ABGene) verschlossen. Dies entspricht einer Ausgangskonzentration von 2µg/ml (LL37 und CD4) bzw. 0,5µg/ml cDNA (GAPDH und CK18) in 25 µl Reaktionsvolumen.

Die semiquantitative Real-Time-PCR ist eine Methode, die Aussagen über die Ausgangsmenge des eingesetzten Templates erlaubt. Im Prinzip besteht das Real-Time-Detektionssystem aus einem PCR-Cycler und einem optischen Detektor, in diesem Fall einem Fluoreszenzphotometer. Die Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen. Der Reaktionsansatz besteht, wie bei einer herkömmlichen PCR, aus genspezifischen Primern, Desoxyribonukleotiden, einer DNA Polymerase und darüber hinaus aus einer genspezifischen Sonde, die im Areal zwischen den Primern bindet und am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Ein am 5'-Ende der Sonde befindlicher sogenannter Quencher unterdrückt die Fluoreszenz durch seine räumliche Nähe. In jedem Zyklus werden durch die 5',3'-Exonukleaseaktivität der verwendeten DNA-Polymerase nur die an ein Template gebundenen Sonden zerstört und das Fluorophor freigesetzt, was Fluoreszenz ermöglicht. (Abb.4) Nicht hybridisierte Einzelstränge bleiben unbeschadet. Die Zunahme der Fluoreszenz ist proportional zur Templatemenge. [50, 51]

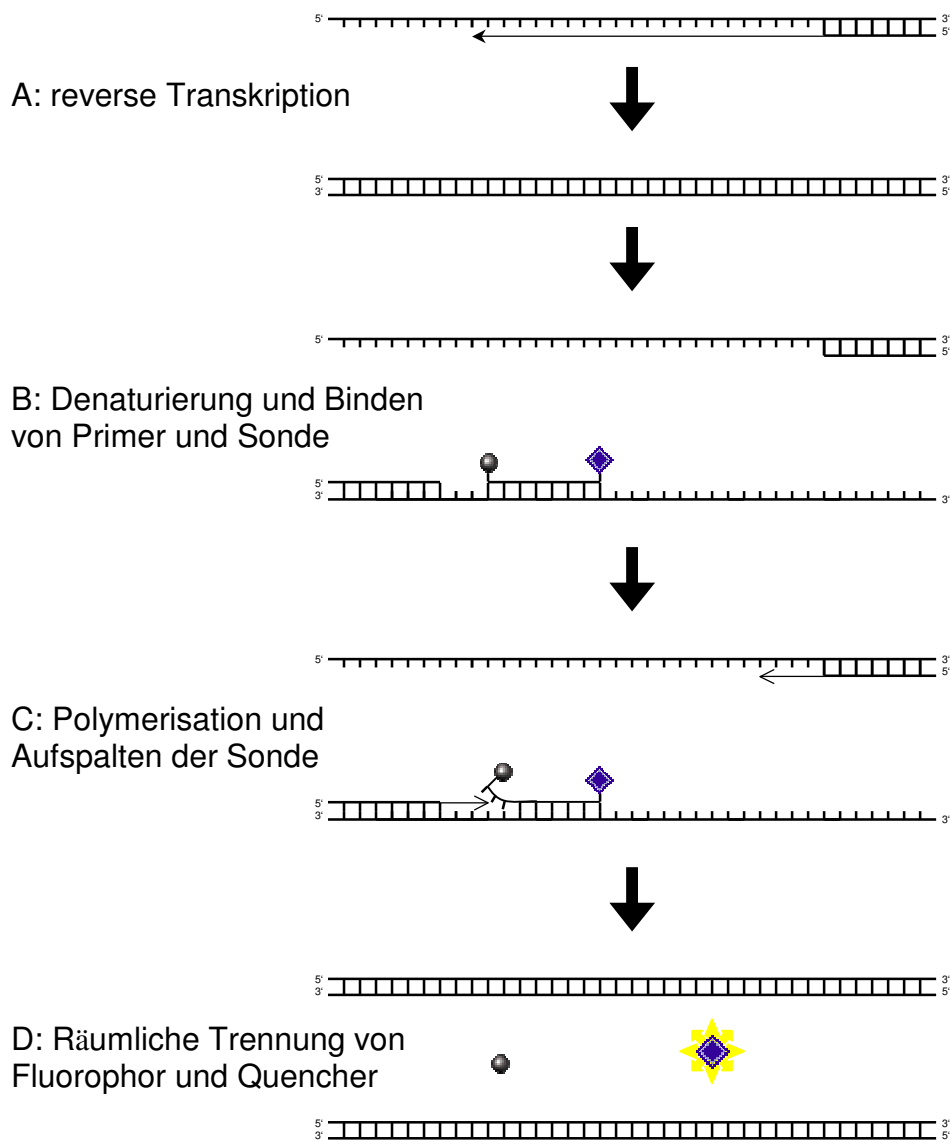


Abb. 4: Real-Time-PCR Reaktion unter Verwendung des Taqman-Verfahrens. Nach reverser Transkription von mRNA in sogenannte komplementär DNA (cDNA) (A) werden der Sens- und Antisensstrang der cDNA bei 92°C getrennt (denaturiert). Der Sens- und Antisensprimer sowie die mit einem Fluorophor am einen und einem sogenannten Quencher am anderen Ende versehene Sonde können nun binden. (B) Die Polymerase, welche auch eine 5'-3'-Nukleaseaktivität besitzt, polymerisiert vom 3'-Ende des Primers (C) und zerstört dabei die sich im Weg befindende Sonde. Fluorophor und Quencher werden somit räumlich getrennt, wobei der Quencher die Fluoreszenz des Fluorophors nicht mehr abschirmen kann. (D) Die Fluoreszenz ist proportional zur gebildeten cDNA Menge. (Abbildung nach Bustin „Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays“ [51])

Vor Beginn der Amplifikation wird im Gerät die Hintergrundfluoreszenz gemessen. Die Rezeptorfluoreszenz ist aufgrund der üblicherweise geringen Templatemenge nicht messbar. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den Hintergrund signifikant übersteigt wird Threshold Cycle oder CT-Wert genannt. Zu diesem Zeitpunkt verläuft die Amplifikation exponentiell und ist nicht durch limitierende Faktoren wie Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition durch Reaktionsprodukte beeinflusst. Bei jedem PCR-Lauf werden parallel bekannte Templatemengen in mehreren Verdünnungsschritten amplifiziert, welche über den CT-Wert zur Berechnung einer Standardgeraden herangezogen werden. Mit dieser kann vom CT-Wert der Unbekannten auf deren Ausgangsmenge geschlossen werden. (Abb.5) [50, 51]

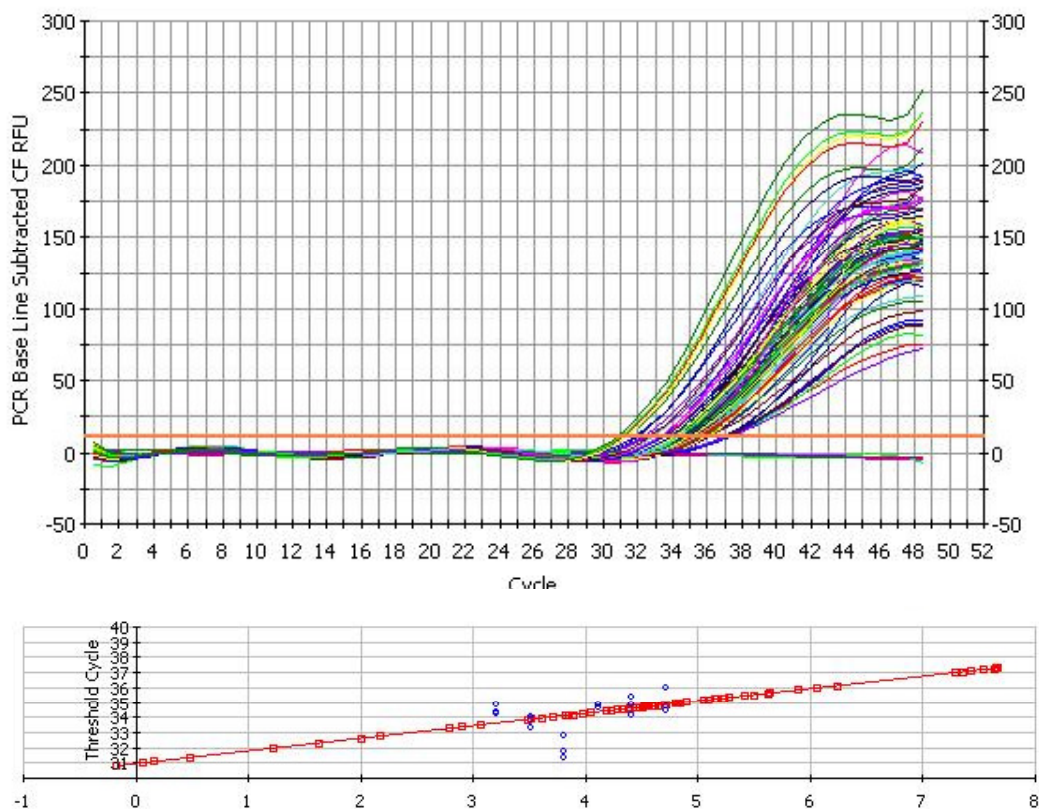


Abb. 5: PCR-Verlaufskurve und Standardgerade einer Real-Time-PCR.

Oben: Einzelkurven-Fluoreszenz gegen PCR-Zyklus, orange: Schwelle, an der die Fluoreszenz den Hintergrund signifikant übersteigt. Derjenige Zyklus, nach dem diese Schwelle überschritten wird, ist der Threshold-Cycle oder CT-Wert.

Unten: Standardgerade CT-Wert gegen Ausgangs-cDNA-Menge, ermittelt aus mitbestimmter U937-cDNA bekannter Ausgangsmengen in 1:2 Verdünnungsschritten.

In dem verwendeten Gerät, dem iCycler von BioRad, wird zur Anregung der Fluorophore ein Laser verwendet und die Extinktion gemessen. Die Sonde des kommerziellen Kits zur Bestimmung von GAPDH war mit VIC markiert, und es wurde die Extinktion bei 530nm gemessen. Alle anderen Parameter waren FAM-markiert und hatten daher eine Extinktionswellenlänge von 490nm. Es wurde bei allen Bestimmungen nach folgendem Reaktionsprotokoll vorgegangen:

	9min	95 °C	Aktivierung der Taq-Polymerase
50x	15sek	92 °C	Denaturierung
	1min	60 °C	Polymerisation
	∞	4 °C	

2.2.5 Immunhistochemische Färbung

Colorektale Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn (n=12) und Colitis ulcerosa (n=13) sowie von gesunden Patienten (n=8), welche sich einer Routinecoloskopie unterzogen hatten, wurde mittels einer Standardbiopsiezange entnommen und sofort in 0,1% Formalin (Merk, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Anschließend wurden die Biopsien in einen Paraffinblock gebettet und mit dem Jung SM 2000R Mikrotom (Leica, Deutschland) in 3-4 µm dicke Schichten geschnitten. Die so gewonnenen Schnitte wurden mit Streckwasser auf einer 30 °C Wärmeplatte vorbehandelt. Das Streckwasser wurde immer frisch aus 40ml doppelt destilliertem Wasser, 10ml Aceton (J.T.Baker, Deventer, Holland) und 0,5ml Eiweiß-Glycerin (Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH&Co, Köngen/N., Deutschland) angesetzt und filtriert. Die in Paraffin eingebetteten Schnitte ziehen sich durch diese Behandlung in die Länge.

Zur Entparaffinierung wurden alle Schnitte zuerst in drei aufeinanderfolgenden Xylol-Bädern (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) für jeweils 10 Minuten belassen. Die Entfettung ist nötig, um ein gutes Färbeergebnis mit wässrigen Färbelösungen zu erreichen. Daraufhin schlossen sich Waschvorgänge in

absteigenden Ethanollösungen an, jeweils zweimal 5 Minuten in 100%, 90% und 70% Ethanol (J.T.Baker). Die Schnitte wurden anschließend bei RT 30 Minuten in 200 ml 100% Methanol (J.T.Baker), das mit 5 ml konzentriertem H₂O₂ (Merck) versetzt war, inkubiert. Währenddessen wurde der PBS/BSA-Puffer aus 36g NaCl, 7,4g NaHPO₄, 2,5g KH₂PO₄ und 0,5g BSA in einem Liter DEPC-H₂O [0,5g/1l BSA] gelöst und auf pH 7,4 titriert. Mit diesem Puffer wurde nun zweimal 5 Minuten auf dem IKA-Vibramax-VXR (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gespült. Pro Schnitt wurden 100µl des 1:10 verdünnten Proteinblockreagens (Power Block™ Universal Blocking Reagent, Biogenex, San Ramon, CA, USA) aufgebracht, 7 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert und im Anschluss eine Minute auf dem IKA-Vibramax gespült. Danach wurden die Serienschnitte mit 1/1000 verdünntem polyklonales LL37 Kaninchenantiserum (25 µg/µl) über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden die Antikörper mit einem Überschuss an synthetischem LL37 geblockt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut zweimal eine Minute auf dem IKA-Vibramax mit PBS/BSA gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen. Aus einem konventionellen Biotin-Streptavidin-Detektionssystem (Multilink®, BioGenex) wurden nun 1-3 Tropfen Multilink (Biotin-markierter 2. Antikörper gegen Kaninchenantikörper) pro Schnitt aufgetragen und 30 Minuten in der feuchten Kammer gelagert. Danach wurde wieder mit PBS/BSA-Puffer zweimal eine Minute auf dem IKA-Vibramax gespült. Analog wurde mit der Markierungssubstanz (Peroxidase-tragender gegen Biotin gerichteter 3. Antikörper) aus demselben System verfahren. Zur Entwicklung wurden die Schnitte in 200µl einer Lösung bestehend aus 7,88g Tris-Hydrochlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland), das bei pH 7.6 in 1l destilliertem Wasser gelöst worden war, 40 mg DAB (Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 35µl H₂O₂ (Merck) gefärbt. Die Peroxidase am 3. Antikörper reduziert das H₂O₂. Die hierdurch erzeugten freien Protonen oxidieren das Chromogen (hier DAB), dadurch entsteht eine bräunliche Färbung. Je nach Ergebnis wurde die Entwicklung nach 1-2 Minuten mit PBS/BSA gestoppt und das Präparat zusätzlich 1-2 Minuten unter destilliertem Wasser gespült. Zuletzt wurden die Präparate mit Mayer's

Hämalaun (Merck) maximal 3 Sekunden gegengefärbt und mit lauwarmem fließenden Wasser 10 Minuten gewaschen. Schlussendlich wurden die Proben noch in eine aufsteigende Alkoholreihe, jeweils 5 Minuten in 70%, 90% und 100% Ethanol, gelegt, mit Entellan (Merck) eingedeckt und mit einem Deckglas überschichtet.

2.3. Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Der Student's t-Test, Mann-Whitney Rank Sum Test und Kurskall-Wallis ANOVA wurden für die Berechnung statistischer Unterschiede verwendet. Als Signifikanzniveau wurden $p < 0,05$ als signifikant bzw. $p < 0,001$ als hochsignifikant angenommen.

3. Ergebnisse

Colonbiopsien von 61 Patienten (21 Morbus Crohn, 15 Colitis ulcerosa, 25 Kontrollen) wurden mittels Real-time -PCR auf Unterschiede der Cathelicidinexpression in entzündeten und nicht entzündeten Darmabschnitten untersucht. Das Biopsiematerial wurde endoskopisch aus makroskopisch entzündeten bzw. nicht entzündeten Abschnitten der Morbus Crohn- (MC) und Colitis ulcerosa- (CU) Patienten gewonnen. Das Material der Kontrollbiopsien stammte aus makroskopisch gesunder Schleimhaut von Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung. Die mittels der Real-time-PCR gewonnenen relativen Transkriptionswerte wurden sowohl auf totale RNA als auch auf GAPDH oder Cytokeratin 18 (CK18) bezogen. Nach Bustin et al. ist ein Vergleich von Werten mehrerer Individuen problematisch, wenn sie mit GAPDH normalisiert sind, da die GAPDH-Genexpression interindividuell deutlich schwankt. [51] Dieser Sachverhalt konnte in unseren Experimenten bestätigt werden, da in allen Ansätzen 1µg Gesamt-RNA eingesetzt wurde und die GAPDH Werte trotzdem erheblich interindividuell differierten. (Abb. 6) Aus diesem Grund werden im Weiteren alle Grafiken auf totale RNA bezogen. Um unterschiedliche Anteile von Epithelzellen in den Biopsien als Fehlerquelle auszuschließen, wurde auch Cytokeratin 18, ein Marker für Epithelzellen, mittels Real-Time-PCR untersucht. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der CK18-Genexpression zwischen einzelnen Biopsien festgestellt werden. Wir gehen deshalb davon aus, dass sich die untersuchten Biopsien nicht wesentlich in ihrem Epithelgehalt unterscheiden.

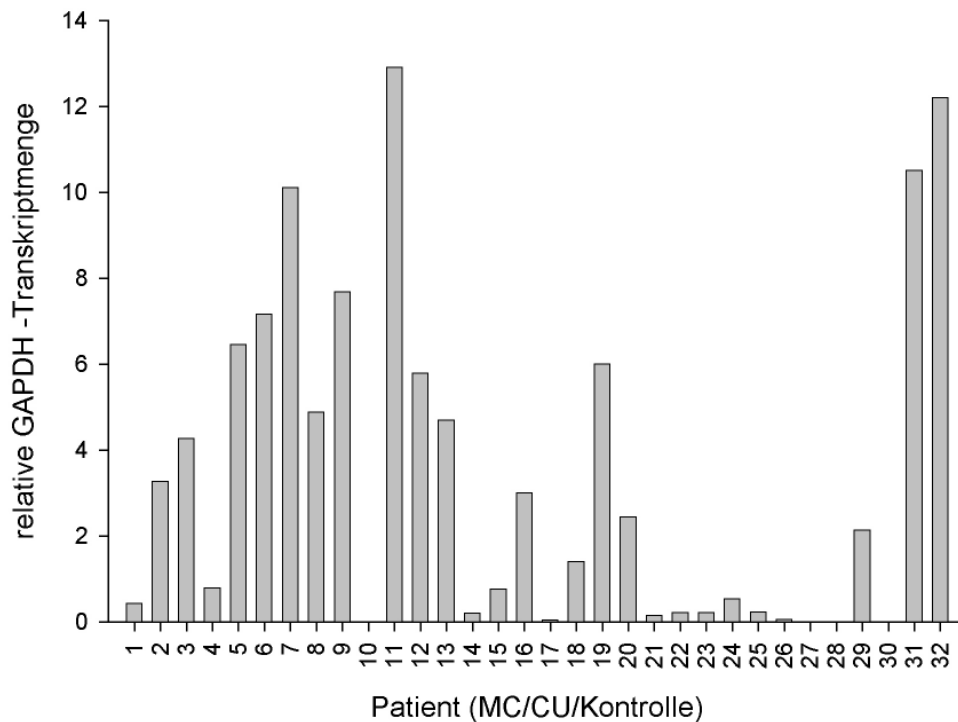


Abb. 6: GAPDH- Genexpression nicht entzündeter Biopsien der ersten 32 analysierten Patienten, sowohl von nicht erkrankten Patienten (Kontrollen) als auch von nicht entzündeten Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU).

3.1. Vergleich der CAMP- Genexpression in Colonmukosa bei Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa- Patienten

Cathelicidine sind körpereigene antibiotisch wirkende Moleküle mit chemotaktischen und immunmodulatorischen Eigenschaften, welche in den letzten Jahren auch in Epithelzellen des gastrointestinalen Trakts nachgewiesen wurden. Dies unterstreicht ihre Rolle in der Erregerabwehr an der Darmmukosa. Ob eine Veränderung der Expression dieser Moleküle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorliegt ist Gegenstand dieser Arbeit. Einer Gruppe von verwandten Molekülen, den induzierbaren Defensinen (HBD2 und HBD3), konnte eine verminderte Induktion bei Morbus Crohn nachgewiesen werden, wohingegen sie bei Colitis ulcerosa in entzündeten Biopsien induziert waren.

Beim Vergleich von nicht entzündeten Colitis ulcerosa-Biopsien mit nicht entzündeten gesunden Kontrollen konnten signifikant höhere CAMP-Genexpressionslevel nachgewiesen werden ($p < 0,01$). Der Unterschied wurde beim Vergleich von entzündeten CU-Proben mit gesunden Kontrollen noch deutlicher ($p < 0,001$). Zwischen den nicht entzündeten und entzündeten Biopsien von CU-Patienten bestand kein signifikanter Unterschied. (Abb. 8) Darüber hinaus waren die Cathelicidin-Genexpressionslevel sowohl in entzündeter als auch in nicht entzündeter Schleimhaut von CU- Patienten signifikant höher als in den MC- Biopsien aus entzündeter oder nicht entzündeter Mukosa. (Abb. 7 und 8)

Ganz im Gegensatz dazu verhielten sich die Expressionslevel von CAMP in Biopsien von MC- Patienten. Es konnte kein signifikanter Unterschied beim Vergleich von Biopsien aus nicht entzündeten und entzündeten Mukosaabschnitten von Morbus Crohn- Patienten und den nicht entzündeten Kontrollen beschrieben werden. Auch bestand kein signifikanter Unterschied zwischen nicht entzündeten und entzündeten Biopsien der MC-Patienten. (Abb. 7)

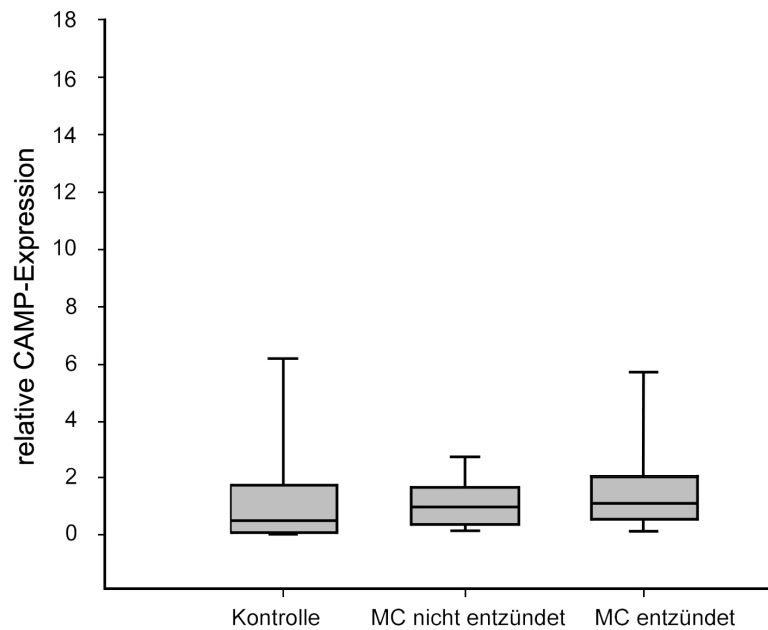


Abb. 7: Cathelicidin-Genexpression in Colonmukosa von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und von gesunden Patienten (Kontrollen). Es wurden jeweils nicht entzündete Kontrollen und entzündete und nicht entzündete Darmabschnitte von MC-Patienten verglichen. (keine Angabe: nicht signifikant)

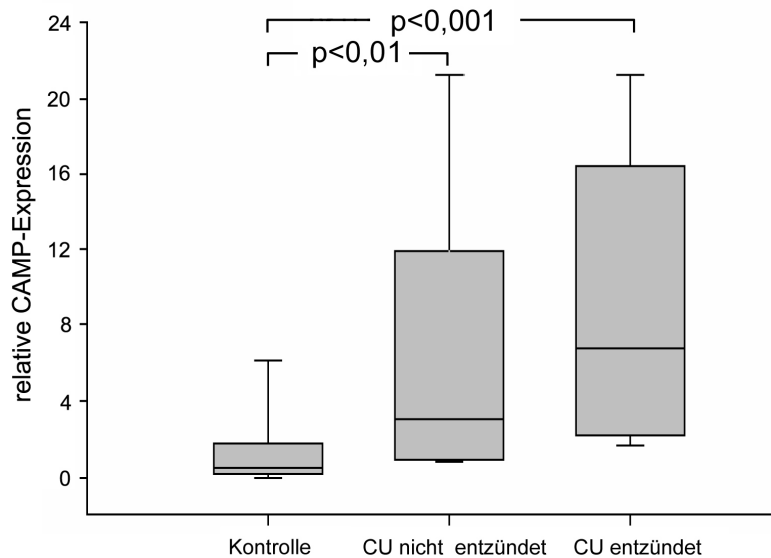


Abb. 8: Cathelicidin-Genexpression in Colonmukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und von gesunden Patienten (Kontrollen). Es wurden jeweils nicht entzündete Kontrollen und entzündete und nicht entzündete Darmabschnitte von CU-Patienten verglichen. (keine Angabe: nicht signifikant)

3.2 Vergleich der CAMP-Genexpression bei Patienten mit Morbus Crohn in Biopsien aus nicht entzündeter und entzündeter Ileummukosa

Die vorausgegangenen Beobachtungen bezogen sich allesamt auf das Colon. Es lagen uns noch 7 Biopsien aus makroskopisch nicht entzündeter sowie 10 Biopsien aus entzündeter Ileumschleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn vor. Auch wurden 7 Ileumbiopsien von gesunden Kontrollprobanden untersucht. Wie im Colon konnte auch im Ileum kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der CAMP-Genexpression zwischen entzündeter und nicht entzündeter Schleimhaut untereinander oder gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. (Abb.: 9)

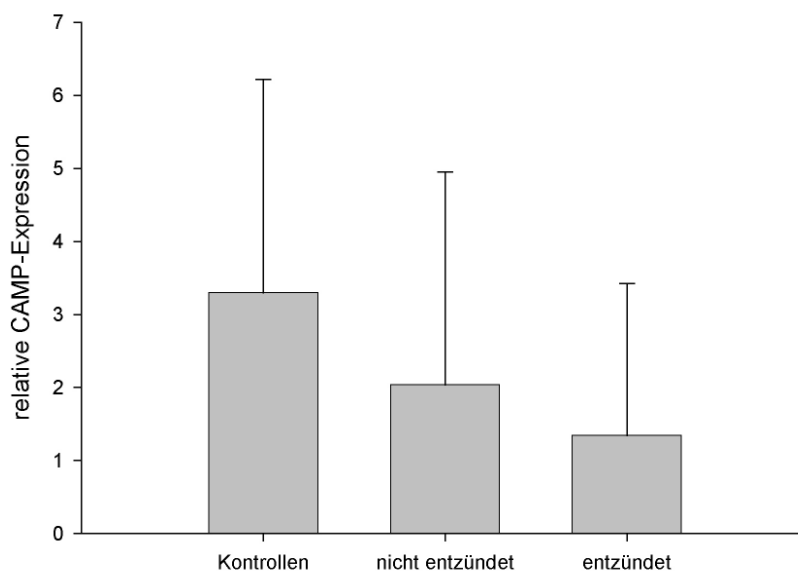


Abb. 9: CAMP-Expression in Ileumbiopsien von Morbus Crohn-Patienten aus Ileumschleimhaut von nicht entzündeten (n=7) und entzündeten (n=10) Biopsien sowie gesunden Probanden (Kontrollen) (n=7). Es konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

3.3 Analyse der Cathelicidin-Expression bei NOD2- Mutationen

Der cytosolische NOD2-Rezeptor identifiziert Muramyldipeptide aus Bakterienwänden von gramnegativen und – positiven Bakterien. Durch Aktivierung des NF κ B-Signalwegs werden verschiedene AMP, unter anderem

LL37, induziert. Eine Loss-of-funktion Mutation prädisponiert für eine fibrostenotische ileale Verlaufsform des Morbus Crohn. Insgesamt acht der analysierten Morbus Crohn-Patienten wiesen eine NOD2-Mutation auf (SNP 13, SNP 8, SNP12). Sechs Biopsien von Patienten mit dieser Mutation von entzündeter Ileumschleimhaut, sieben von nicht entzündeter und vier von entzündeter Kolonschleimhaut. Es konnte kein signifikanter Unterschied beim Vergleich von entzündeten und nicht entzündeten Biopsien festgestellt werden. Beim Vergleich der entzündeten Ileum-Proben mit NOD2-Mutation mit Ileum-Biopsien des gesunden Normalkollektivs ohne NOD2- Mutation wurde die statistische Signifikanz knapp nicht erreicht. ($p=0,059$) (Abb.: 10)

Im Colon scheint die CAMP-Genexpression bei Patienten mit NOD2-Mutation eher erhöht zu sein. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. (Abb.: 11)

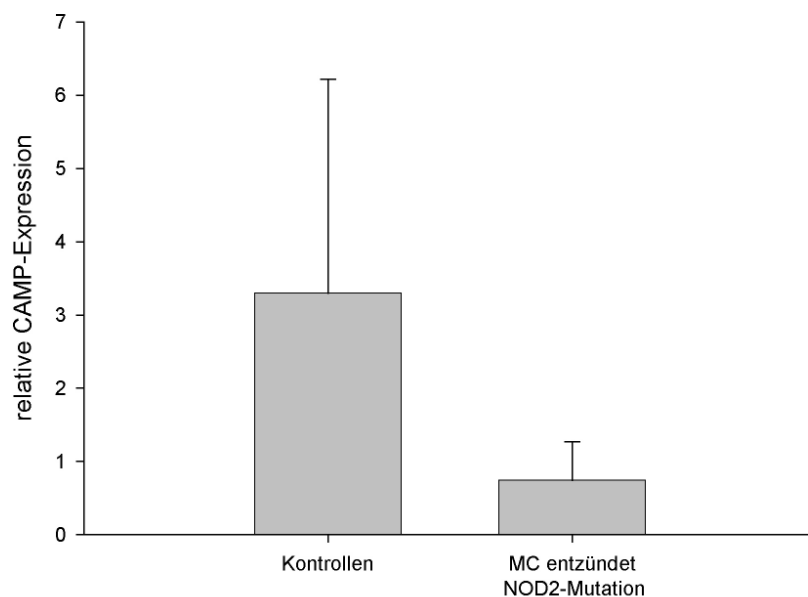


Abb. 10: CAMP-Expression von makroskopisch entzündeten Ileumproben von Morbus Crohn-Patienten mit NOD2-Mutationen (n=6) und gesunden Probanden (Kontrollen) (n=7). Signifikanz knapp verfehlt, aber Trend zu verringerten Expressionsleveln beim Vergleich von entzündeten Morbus Crohn-Biopsien und Ileum-Kontrollen ohne NOD2-Mutation erkennbar ($p=0,059$). Keine nicht entzündeten Ileumbiopsien von MC-Patienten mit NOD2-Mutation vorhanden.

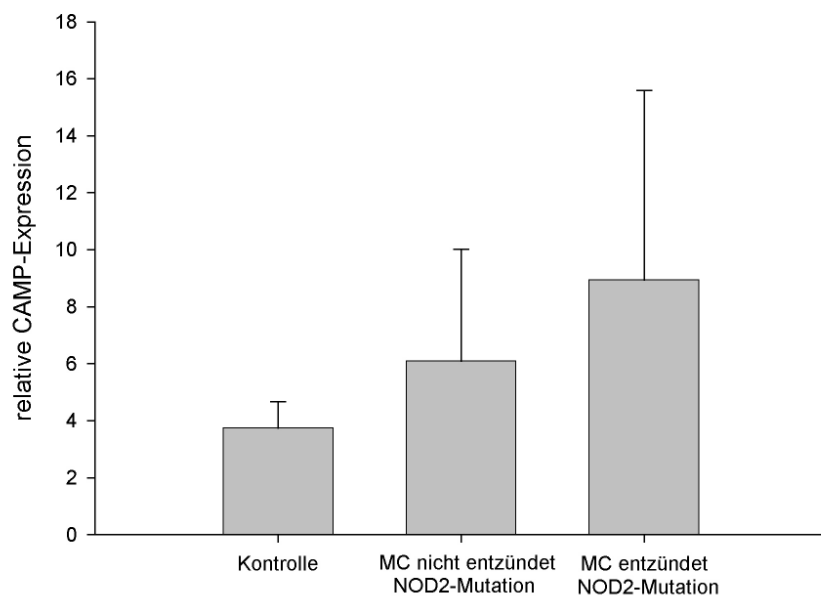


Abb. 11: CAMP-Expression von Colonbiopsien von makroskopisch nicht entzündeten (n=6) und entzündeten (n=4) Morbus Crohn-Patienten mit NOD2-Mutationen und gesunden Probanden (Kontrollen). Kein signifikanter Unterschied.

3.4 Analyse der CD4+-Lymphozytenzahl in entzündeten Morbus Crohn-Biopsien

Um die Entzündungsaktivität zu quantifizieren und den durch Lymphozyten gebildeten Cathelicidinanteil abzuschätzen, bestimmten wir CD4 mRNA ebenfalls mittels Real-Time-PCR. Hierfür wurden sowohl entzündete als auch nicht entzündete Biopsien von 11 Morbus Crohn-Patienten analysiert. Wegen seiner Spezifität für Entzündungszellen und seiner reinen Proteinstruktur ohne Zuckerreste wurde CD4 als Surrogatmarker gewählt. Da sich die beiden untersuchten Formen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa, wesentlich durch die Art der T-Zell-Antwort unterscheiden, T_H1 bei MC versus T_H2 bei CU, diese T-Helferzellen aber beide CD4 positiv sind, ist eine grobe Beurteilung der Leukozytenzahl in der Biopsie trotz des nur relativ kleinen erfassten Anteils dennoch möglich. Für

die eher lymphozytär-granulomatös geprägte Entzündung des Morbus Crohn zeigten sich Werte deutlich oberhalb der Nachweisgrenze. Wie zu erwarten zeigte sich ein circa 2,4-fach erhöhter CD4-Wert in den entzündeten Biopsien der MC Patienten im Vergleich zu den nicht entzündeten ($p < 0,05$). (Abb. 12)

Trotz dieser erhöhten Zahl an Lymphozyten in den entzündeten Biopsien, welche ebenfalls als Quelle des LL37 fungieren können, ist bei den MC-Patienten keine erhöhte Cathelicidinexpression zu verzeichnen. Diese Beobachtung unterstützt die von Fellerman et al. aufgestellte Hypothese, der Morbus Crohn sei ein Mangelsyndrom antimikrobieller Peptide. [33] Bei der von Natürlichen Killer-T-Zellen und zumindest im Frühstadium von Neutrophilen geprägten Colitis ulcerosa befand sich der CD4-mRNA Anteil in den meisten Fällen sowohl in den entzündeten als auch in den nicht entzündeten Biopsien unterhalb der Nachweisgrenze. [35]

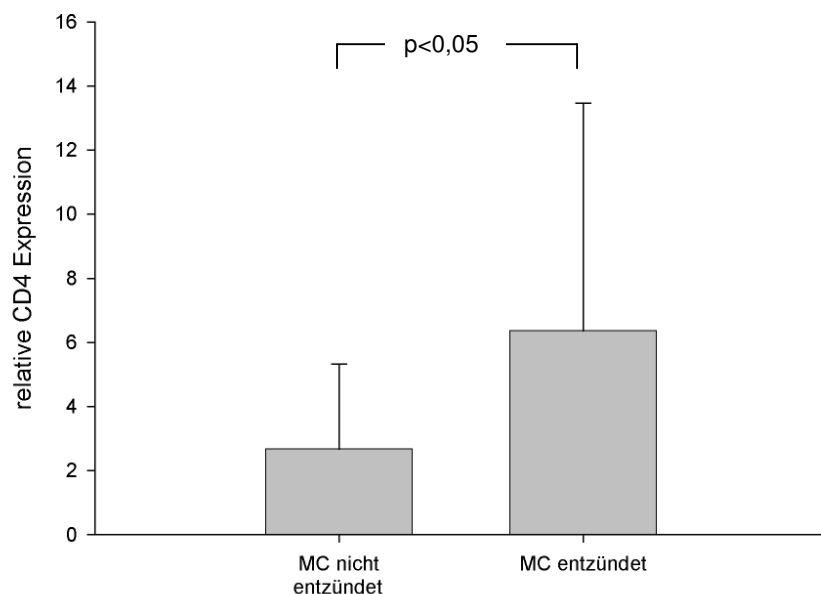


Abb. 12: Relative CD4-Genexpression in Biopsien von Morbus Crohn- (MC) Patienten (n=11). Signifikanter Unterschied der CD4-Genexpression in den entzündeten Biopsien im Vergleich zu den nicht entzündeten. ($p < 0,05$) Bei den Colitis ulcerosa-Proben befanden sich die CD4-Expressionswerte überwiegend unterhalb der Nachweisgrenze.

3.5 Cathelicidin-Peptid-Expression in der Colonmukosa von Patienten mit CED mittels Immunhistochemie

Durch immunhistochemische Färbungen konnte gezeigt werden, dass Biopsien von Patienten mit CED ein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zu normalen Proben zeigen. Während in gesundem Epithel die Zellen der Kryptenspitzen LL37-Produktion ohne intrazelluläre Akzentuierung zeigen, konnte in den Zellen der Kryptenspitzen aus Biopsien von Patienten mit CED ausschließlich an der basalen Seite ein granuläres Verteilungsmuster nachgewiesen werden. Auch unterschieden sich die entzündeten nicht von den nicht entzündeten Proben sowohl der Morbus Crohn-Patienten als auch der Colitis ulcerosa-Patienten. Ebenfalls konnte kein Unterschied im Verteilungsmuster zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachgewiesen werden. (Abb. 13) Die Abbildungen A und B zeigen eine Positivkontrolle des polyklonalen LL37-Antikörper in 100-facher bzw. 250-facher Vergrößerung. Hier sieht man das typische Verteilungsmuster des gesunden Colonepithels homogene intrazelluläre Anfärbung ausschließlich in Zellen der Kryptenspitzen. [32] Für die Negativkontrolle (C) wurde vor der Färbung der Kontrollbiopsie der LL37-Antikörper mit synthetischem LL37 absorbiert. Keine Anfärbung konnte beobachtet werden. Die Abbildungen D und E stammen von Morbus Crohn-Patienten und zeigen ein pathologisches Färbeverhalten. Gleiches gilt auch für Abbildung F eines Colitis ulcerosa-Patienten.

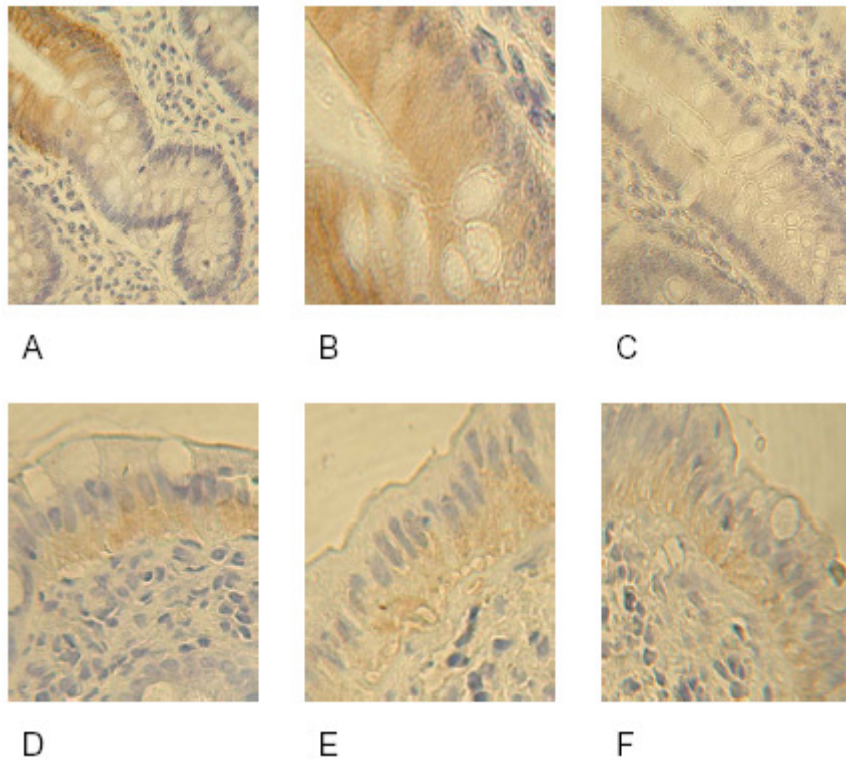


Abb. 13: Immunhistochemische Färbungen zum LL37-Peptid Nachweis in Colonbiopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Positivkontrolle mit dem polyklonalen LL37-Antikörpers an gesunder Colonschleimhaut mit 100-facher (A) bzw. 250-facher Vergrößerung (B). Als Negativkontrolle (C) wurde der LL37- Antikörper vor der Färbung mit synthetischem LL37 absorbiert. Bei Patienten mit Morbus Crohn (D, E) und Colitis ulcerosa (F) wurde eine granuläre und an der Basis der Enterozyten betonte Anfärbung beobachtet.

4. Diskussion:

Der Darm, vor allem der Dickdarm, ist eine Grenzfläche des Körpers, welche einer hohen Mikrobendichte gegenübersteht. Um die Integrität des Wirtes zu schützen stehen dem Epithel neben der rein physikalischen Barriere durch Tight-Junktions und Epithelabschließung eine Vielzahl an Effektorsubstanzen zu Verfügung. Diese Effektorsubstanzen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Lysozym und antimikrobiellen Peptide wie die Defensine und Cathelicidine tragen zur unspezifischen Erregerabwehr an dieser Grenzfläche bei. Cathelicidine sind wichtige Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems der Säugetiere mit direkter antimikrobieller Wirkung auf verschiedene Pathogene wie gram-positive und gram-negative Bakterien, verschiedene Viren und Protozoen. [1] CRAMP- (ein murines Cathelicidin) Knockout-Mäuse sind anfälliger gegenüber invasiven Hautinfektionen, was die Bedeutung der Cathelicidine *in vivo* unterstreicht. [52] Ebenso zeigen Mäuse mit vermindertem Defensinspiegel im Duodenum eine größere Infektanfälligkeit nach oraler Salmonellenaufnahme. [53] Darüber hinaus macht eine verminderte Cathelicidinkonzentration an der Epitheloberfläche eine Besiedlung des Epithels mit adhärenenten Bakterienstämmen erst möglich und begünstigt dadurch die bakterielle Invasion ins subepitheliale Gewebe. [54] *Shigella supp.* können erst nach Herabregulation der Cathelicidin- und hBD-1-Expression, via Plasmid-DNA, die Epithelbarriere überwinden und zur Infektion führen. [27] Auch haben sich Beweise gefunden, dass Cathelicidine eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Kostmann-Syndroms und der atopischen Dermatitis spielen. [25, 55]

In Übereinstimmung mit früher veröffentlichten Studien über Defensine und Lysozym bei CED ist die Cathelicidinexpression bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa unterschiedlich. Während in entzündeter und nicht entzündeter Colonmukosa von CU-Patienten die CAMP-Expression erhöht ist, konnte weder bei entzündeten noch bei nicht entzündeten Dickdarmabschnitten von MC-Patienten eine Induktion der Cathelicidin-mRNA beim Vergleich mit nicht

entzündeten, gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Eine vermehrte Expression von HBD2 und HBD3 zeigte sich auch in makroskopisch entzündeten und nicht entzündeten Darmabschnitten von CU-Patienten. [56] Im Gegensatz dazu ist die Expression der induzierbaren β -Defensine (HBD2 und HBD3) weder in entzündeten noch in nicht entzündeten Darmabschnitten von MC-Patienten erhöht, was auf eine insuffiziente Epithelbarriere hinweisen könnte. Im terminalen Ileum scheint sogar eine verminderte Cathelicidin-Expression beim MC stattzufinden, verglichen mit nicht entzündeten, gesunden Ileumproben. Das Signifikanzniveau wurde aber nicht erreicht. Betrachtet man aus diesem Kollektiv nur Patienten mit NOD2-Mutation verfehlt dieser Trend die Signifikanz nur knapp. Im Colon stellt sich dies anders dar. Es zeigt sich eher eine Erhöhung der Cathelicidinexpression im Colon bei NOD2-Mutation. Dies legt eine unterschiedliche Regulation der Cathelicidinexpression im Ileum und im Colon und einen unterschiedlichen Signalweg des NOD2-Rezeptors nahe. Der fehlende Anstieg der Cathelicidinexpression ist kein Ausdruck fehlender Entzündungsaktivität in den untersuchten Biopsien. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung von CD4-mRNA in den entzündeten Biopsien bei MC-Patienten.

In einer Studie von Hase et al. wurde die Expression von Cathelicidin im Colonepithel von Colitis ulcerosa-Patienten untersucht. [31] Die Cathelicidinexpression im Colon und Ileum bei MC wurde bis dato noch nicht erforscht. Nicht entzündete Ileummukosa von Patienten ohne CED zeigt eine starke LL37-Expression. [32] Wenn die Cathelicidin-Transkriptlevel von nicht entzündeter und entzündeter Ileumschleimhaut von MC Patienten mit gesunder Kontrollmukosa verglichen wird, zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Hase et al. untersuchten ihr Biopsiematerial mittels Immunhistochemie, die Cathelicidingenexpression wurde nicht untersucht. [31] In dieser Arbeit wurden insgesamt 89 Patienten quantitativ auf Cathelicidin-Genexpression untersucht. Die alleinige Untersuchung mittels Immunhistochemie spiegelt wohl nicht die Cathelicidin-Peptid-Expression der Darmmukosa wieder, da diese Technik nicht

quantitativ ist. Darüber hinaus könnte eine vermehrte Anfärbarkeit verminderte Sekretion und mehr Speicherung bedeuten und nicht mehr Produktion.

Neben Epithelzellen wird LL37 auch von verschiedenen Entzündungszellen exprimiert. [3] Unreife Knochenmarkszellen zeigen starke Expression des Cathelicidins. [57] Während der Reifung zu Granulozyten verliert sich dies. [57] Auch konnte in Neutrophilen im peripheren Blut keine LL37-mRNA nachgewiesen werden. [57, 58] Auch wenn in entzündeter Mukosa von MC-Patienten mit hoher Entzündungszellzahl keine Änderung der CAMP-Expression nachgewiesen werden konnte, ist die entdeckte Erhöhung der CAMP-Expression in CU-Biopsiematerial wohl durch eine erhöhte epitheliale Genexpression verursacht.

Die Expression von einigen AMP wie zum Beispiel HBD2 wird durch Entzündungsmediatoren wie Interleukine via Nf- κ B Aktivierung reguliert. [30] Der Regulationsmechanismus und die Signalwege, die bei der Kontrolle der Cathelicidinexpression eine Rolle spielen, sind bisher nur teilweise erforscht. Die Entzündungsreaktion bei Colitis ulcerosa scheint durch T_H2-Cytokine, wie IL-4 und IL-13, unterhalten zu werden. [35] Diese Entzündungsmediatoren induzieren die Cathelicidinexpression in Colonepithelzellen *in vitro* nicht. [32] Kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat induzieren die Reifung der Epithelzellen und gleichzeitig Cathelicidinexpression in den höher differenzierten Epithelzellen an den Kryptenspitzen des Colons. [31, 32] Da die Colonmukosa bei der CU zusätzlich zu Entzündungsmediatoren auch durch Butyrat stimuliert wird, wurde auch die Kombination von verschiedenen Stimuli auf ihren Effekt auf die Cathelicidinexpression untersucht. IL-4 und IL-13 hatten keinen zusätzlichen Effekt auf die durch Butyrat erzeugte Induktion des Cathelicidins in Colonepithelzellen. Interessanterweise zeigt sich bei der atopischen Dermatitis, einer anderen chronischen T_H2 induzierten Erkrankung, eine Blockade der HBD2-Expression in den Keratinozyten durch IL-4 und IL-13. [59] Dies führt zu einer verminderten Konzentration von HBD2 und einer vermehrten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen. [25] Dieser Unterschied, verminderte

Peptidexpression von AMP bei einer T_H2-induzierten Hauterkrankung und vermehrte Cathelicidinexpression bei einer T_H2-induzierten Darmerkrankung, spricht für eine unterschiedliche Regulation in verschiedenen Epithelien.

Es bleibt noch zu klären ob eine verminderte Genexpression bei MC oder eine vermehrte bei CU auch mit einer verminderten bzw. erhöhten antimikrobiellen Aktivität einhergeht. Cathelicidine werden in den Epithelien in ihrer Proform gespeichert und ihre antimikrobielle Aktivität hängt von der Prozessierung zum aktiven Peptid und dessen Sekretion ab. [18, 27] In dieser Studie konnte kein Unterschied in der Cathelicidin-Peptidexpression des Colonepithels bei MC und CU nachgewiesen werden. Dies stimmt mit früher gemachten Beobachtungen bei CU überein. [31]

Erhöhte Cathelicidin-mRNA-Expressionslevel, welche vermehrte Produktion implizieren, stehen im Widerspruch zu dem immunhistochemischen Färbeverhalten von Biopsiegewebe der CU-Patienten. Die verminderte Anfärbung könnte auf einen Translationsdefekt oder auf erhöhte Sekretion und verminderte Speicherung des Peptids hindeuten. Darüber hinaus wird LL37 auf der Haut nach Sekretion in verschiedene andere neue antimikrobielle Peptide gespalten. [60] Diese neuen Peptide zeichnen sich durch eine erhöhte antimikrobielle Aktivität mit unterschiedlichem Spektrum und verminderte systemische immunmodulatorische Potenz aus. [60] Die Produkte der postsekretorischen Prozessierung von LL37 im Darmlumen bei gesunden Individuen und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind noch nicht bekannt. Eine veränderte postsekretorische Prozessierung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen könnte das vom Normalkollektiv abweichende Färbeverhalten erklären.

Zusätzlich zu ihrer Rolle als endogene Antibiotika haben Cathelicidine noch andere Funktionen wie Chemotaxis [24], LPS-Neutralisierung [61] sowie Aktivierung oder Modulation von Mastzellen, Leukozyten und Dendritischen Zellen. [4, 62] Die Cathelicidin-Expression ist auch in verletzten Hautabschnitten erhöht, und LL37 spielt bei der Proliferation von Keratinozyten

und der Wundheilung eine Rolle. [63] Weitere Studien müssen die Rolle des LL37 bei der Heilung verletzter Darmmukosa klären.

Beim Morbus Crohn scheint die Epithelbarriere durch verminderte Aktivität der vom Epithel sezernierten antimikrobiellen Peptide weniger effektiv zu funktionieren.

Auch die zelluläre Seite des angeborenen Immunsystems, die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, wurden bei Morbus Crohn-Patienten untersucht. Bei erkrankten Individuen zeigte sich hierbei verminderte Rekrutierung von Neutrophilen nach kleinen Haut- oder Darmverletzungen. Es stehen also weniger Neutrophile, deren primäre Aufgabe die Phagozytose und Elimination von eindringenden Fremdstoffen ist, in der Akutphase der Entzündung zur primären Elimination der Noxe zu Verfügung. [64] Diese Aufgabe muss dann bei diesen Patienten zum größeren Teil von Makrophagen wahrgenommen werden, deren größere Potenz zur Aktivierung des Immunsystems zu einer stärkeren und längeren Entzündungsreaktion führt. Der Grund, weshalb weniger neutrophile Granulozyten einwandern, liegt nicht bei verminderter Migrationspotenz der Granulozyten, sondern eher in verminderter Expression von Chemotaxinen wie IL-8, IL-1 β durch Gewebsmakrophagen [64] oder LL37 durch das Epithel. Verminderte Neutrophilenzahlen oder IL-8-/IL-1 β -Level in Hautläsionen konnten weder bei gesunden Patienten noch bei Patienten, die an Colitis ulcerosa oder rheumatoider Arthritis leiden, gefunden werden. [64] Zur Kontrolle bakterieller Invasion ist eine Mindestzahl an Neutrophilen notwendig, unabhängig von der Bakterienausgangskonzentration. [65] Stehen zu wenig Neutrophile zur Elimination des eindringenden Agens zu Verfügung, werden initial vermehrt Mikroben oder deren Bestandteile durch Makrophagen prozessiert und somit das Immunsystem vermehrt stimuliert. [64] Eine erhöhte systemische Immunreaktion mit erhöhten Serumspiegeln von CRP und IL-6 und erhöhten Neutrophilenzahlen im zirkulierenden Blut konnte bei MC nach Haut- oder Darm Läsionen nachgewiesen werden. [64] Wahrscheinlich ist die Aktivität des angeborenen Immunsystems normalverteilt, wobei sowohl genetische Faktoren als auch die Zahl der subklinischen bakteriellen oder

parasitären Infektionen in der Kindheit eine Rolle spielen. Die Individuen am unteren Ende der Normalverteilungskurve sind unter Umständen gegenüber Morbus Crohn empfänglicher. [64] Für eine ineffiziente Eliminierung eindringender Mikroorganismen spricht auch das Vorhandensein von Bakterien-DNA, nicht nur von *Mykobakterium paratuberculosis* [66, 67] sondern auch von *E. coli* [68] in Granulomen bei MC, nicht aber in anderen Nicht-Crohn-Granulomen. Zudem entwickeln Mäuse welche unter sterilen Bedingungen aufgezogen werden keine CED. [35]

Die Colitis ulcerosa zeigt in dieser und anderen Studien eine vermehrte Expression von antimikrobiellen Peptiden und Lysozym. [56, 69] Diese Erhöhung der Expression könnte Ausdruck einer „normalen“ Reaktion des Epithels auf eine erhöhte systemische Entzündungsbereitschaft sein. Die vermehrte Coinzidenz von Colitis ulcerosa mit Autoantikörpern wie pANCA (60-70%) könnte Hinweise auf diese Hypothese geben. [35] Auch die Wirksamkeit sogenannter probiotischer Bakterienstämme wie zum Beispiel *Lactobacillus species* oder *E. coli Nissle*, bei denen immuninhibitorische Effekte via IL10 Induktion oder Rezeptorblockade gegenüber adhäsiven Bakterienstämmen, diskutiert werden sprechen für eine überschießende Immunreaktion bei Colitis ulcerosa. [35, 70, 71] Einige Antibiotika wie Metronidazol, Tobramycin und Ciprofloxacin zeigen Wirkung bei der Remissionsinduktion und –aufrechterhaltung, was als Indiz für eine bakterielle Beteiligung in der Pathogenese der Colitis ulcerosa gedeutet werden kann. [35, 70]

Wir konnten zeigen, dass bei Patienten mit Morbus Crohn die Expression von LL37 ebenso wie die der induzierbaren Defensinen nicht erhöht ist. Ob die fehlende Induktion der Expression mit verminderter luminaler Peptidmenge einhergeht, bleibt noch zu untersuchen. Die Funktion der Neutrophilen scheint ebenso gestört, was in der Zusammenschau auf ein weniger aktives oder weniger effektiv arbeitendes angeborenes Immunsystem bei Morbus Crohn-Patienten hinweisen könnte. Die pathogenetische Relevanz dieser Beobachtungen bleibt noch zu klären.

Im Gegensatz dazu ist die Expression bei Colitis ulcerosa erhöht. Dies könnte auf eine erhöhte systemische Entzündungsbereitschaft hindeuten. Die Peptidmenge war allerdings nicht erhöht. Diese Diskrepanz lässt sich entweder mit einer verminderten Speicherung bzw. einem erhöhten Verbrauch erklären oder könnte Ausdruck einer postsekretorischen Prozessierung sein, wie sie an der Haut beobachtet wurde. [60]

5. Zusammenfassung:

Es zeigt sich ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa ist die Cathelicidin-mRNA-Expression erhöht, was sich aber nicht in vermehrter immunhistochemischer Anfärbbarkeit widerspiegelt. Welche Zusammenhänge dahinter stehen, bedarf noch weiterer Untersuchung. Insbesondere in den entzündeten Darmabschnitten ist die CAMP-Expression erhöht. Es konnte bis jetzt jedoch kein Auslöser dafür gefunden werden. Ob sich hinter dem erhöhten Cathelicidinexpressionslevel in den entzündeten Biopsien eine normale Entzündungsreaktion des angeborenen Immunsystems verbirgt oder die erhöhten Cathelicidinlevel an der Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung ursächlich beteiligt sind, bedarf ebenfalls noch weiterer Studien. Beim Morbus Crohn hingegen zeigt sich keine Induktion von antimikrobiellen Peptiden, weder in nicht entzündeten noch in entzündeten Darmabschnitten, verglichen mit Biopsiematerial von Kontrollprobanden ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung. Auch wurde eine verminderte initiale Neutrophilenrekrutierung nach Verletzung des Darms oder der Haut bei Patienten mit Morbus Crohn beschrieben. [64] Dies spricht für eine Schwäche des angeborenen Immunsystems, was mit einer höheren Verletzlichkeit der Epithelbarriere und somit vermehrter Adhäsion und Invasion von Bakterien einhergehen könnte. Die insuffiziente initiale Eliminierung dieser eindringenden Mikroorganismen durch Neutrophile kann zur Persistenz von Bakterien oder -bestandteilen im subepithelialen Gewebe und somit zur chronischen Entzündung führen.

6. Abkürzungen:

AMP	antimikrobielle Peptide
BSA	bovines Serumalbumin
CARD	caspase recruitment domain
CD4	cluster of differentiation 4
cDNA	komplementär DNA
CK18	Cytokeratin 18
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLG5	Discs large homolog 5 (Drosophila)
FAM	6-carboxy-Fluoreszin-Farbstoff
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GI	gastrointestinal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
INF α	Interferon α
LPS	Lipopolysaccharide
MC	Morbus Crohn
NaHPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
OCTN	organic cation transporter
PANCA	perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaktion
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disorder

SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T84	Colocarzinom-Zellreihe (kulturell vermehrt)
TGF β	Transforming growth factor β
TNBS	Trinitrobenzensulfonat
TNF α	Tumornekrosefaktor α
U937	Monozyten-Zellreihe (kulturell vermehrt)
VIC	Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems, die chemische Struktur ist nicht publiziert

7. Referenzen:

1. Zaiou, M. and R.L. Gallo, *Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics*. J Mol Med, 2002. **80**(9): p. 549-61.
2. Bals, R., *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*. Respir Res, 2000. **1**(3): p. 141-50.
3. Agerberth, B., et al., *The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3086-93.
4. Davidson, D.J., et al., *The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1146-56.
5. Bowdish, D.M., et al., *Impact of LL-37 on anti-infective immunity*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(4): p. 451-9.
6. Smeianov, V., K. Scott, and G. Reid, *Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora*. Microbes Infect, 2000. **2**(7): p. 773-7.
7. Hase, K., et al., *Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1613-25.
8. Bals, R. and J.M. Wilson, *Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(4): p. 711-20.
9. Oren, Z., et al., *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): p. 501-13.
10. Oppenheim, J.J., et al., *Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity*. Ann Rheum Dis, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii17-21.
11. Cunliffe, R.N. and Y.R. Mahida, *Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(1): p. 49-58.

12. O'Neil, D.A., et al., *Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with Helicobacter pylori or stimulation with interleukin-1*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5412-5.
13. Harder, J., et al., *Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5707-13.
14. Garcia, J.R., et al., *Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity*. Faseb J, 2001. **15**(10): p. 1819-21.
15. Schmid, M., et al., *[The role of defensins in the pathogenesis of chronic-inflammatory bowel disease]*. Z Gastroenterol, 2004. **42**(4): p. 333-8.
16. Bals, R., et al., *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**(16): p. 9541-6.
17. Frohm, M., et al., *The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders*. J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15258-63.
18. Zaiou, M., V. Nizet, and R.L. Gallo, *Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(5): p. 810-6.
19. Zanetti, M., et al., *Structure and biology of cathelicidins*. Adv Exp Med Biol, 2000. **479**: p. 203-18.
20. Sorensen, O.E., et al., *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3951-9.
21. Zanetti, M., R. Gennaro, and D. Romeo, *Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain*. FEBS Lett, 1995. **374**(1): p. 1-5.
22. Panyutich, A., et al., *Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptidins*. Infect Immun, 1997. **65**(3): p. 978-85.

23. Scocchi, M., et al., *Proteolytic cleavage by neutrophil elastase converts inactive storage proforms to antibacterial bactenecins*. Eur J Biochem, 1992. **209**(2): p. 589-95.
24. De, Y., 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**(7): p. 1069-74.
25. Ong, P.Y., et al., *Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis*. N Engl J Med, 2002. **347**(15): p. 1151-60.
26. Koczulla, R., et al., *An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18*. J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1665-72.
27. Islam, D., et al., *Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 180-5.
28. Salzman, N.H., et al., *Enteric salmonella infection inhibits Paneth cell antimicrobial peptide expression*. Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1109-15.
29. Salzman, N.H., et al., *Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin*. Nature, 2003. **422**(6931): p. 522-6.
30. O'Neil, D.A., et al., *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6718-24.
31. Hase, K., et al., *Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 953-63.
32. Schaubert, J., et al., *Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways*. Gut, 2003. **52**(5): p. 735-41.
33. Fellermann, K., et al., *Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2003. **15**(6): p. 627-34.
34. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease pathogenesis: therapeutic implications*. Chin J Dig Dis, 2005. **6**(1): p. 6-9.

35. Bouma, G. and W. Strober, *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(7): p. 521-33.
36. Mahler, M. and E.H. Leiter, *Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice*. Inflamm Bowel Dis, 2002. **8**(5): p. 347-55.
37. Cario, E., *Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2*. Gut, 2005. **54**(8): p. 1182-93.
38. Sartor, R.B., *The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation*. Res Immunol, 1997. **148**(8-9): p. 567-76.
39. Chandran, P., et al., *Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (I)*. Surgeon, 2003. **1**(2): p. 63-75.
40. Podolsky, D.K., *The current future understanding of inflammatory bowel disease*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002. **16**(6): p. 933-43.
41. Madsen, K.L., et al., *Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice*. Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1107-14.
42. Duchmann, R., et al., *Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD)*. Clin Exp Immunol, 1995. **102**(3): p. 448-55.
43. Powrie, F., et al., *Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice*. Int Immunol, 1993. **5**(11): p. 1461-71.
44. Parronchi, P., et al., *Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease*. Am J Pathol, 1997. **150**(3): p. 823-32.
45. Heller, F., et al., *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 629-38.
46. Fuss, I.J., et al., *Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5*. J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1261-70.

47. Das, K.M., et al., *Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin. A clue to the pathogenetic mechanism for ulcerative colitis*. J Immunol, 1993. **150**(6): p. 2487-93.
48. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
49. Wehkamp, J., et al., *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
50. Wilfingsender, D. and H. Stoiber, *Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren*. Antibiotika Monitor, 2002. **1/2/2002 18. Jahrgang**.
51. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
52. Nizet, V., et al., *Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection*. Nature, 2001. **414**(6862): p. 454-7.
53. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. Science, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
54. Iimura, M., et al., *Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4901-7.
55. Putsep, K., et al., *Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study*. Lancet, 2002. **360**(9340): p. 1144-9.
56. Wehkamp, J., et al., *Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2003. **9**(4): p. 215-23.
57. Wu, H., et al., *Cathelicidin gene expression in porcine tissues: roles in ontogeny and tissue specificity*. Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 439-42.
58. Agerberth, B., et al., *FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(1): p. 195-9.

59. Nomura, I., et al., *Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3262-9.
60. Murakami, M., et al., *Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3070-7.
61. Kirikae, T., et al., *Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia*. Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 1861-8.
62. Scott, M.G., et al., *The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3883-91.
63. Heilborn, J.D., 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*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(3): p. 379-89.
64. Marks, D.J., et al., *Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation*. Lancet, 2006. **367**(9511): p. 668-78.
65. Li, Y., et al., *Determination of the critical concentration of neutrophils required to block bacterial growth in tissues*. J Exp Med, 2004. **200**(5): p. 613-22.
66. Ryan, P., et al., *Mycobacterium paratuberculosis detected by nested PCR in intestinal granulomas isolated by LCM in cases of Crohn's disease*. Methods Mol Biol, 2002. **193**: p. 205-11.
67. Ryan, P., et al., *PCR detection of Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection*. Gut, 2002. **51**(5): p. 665-70.
68. Ryan, P., et al., *Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(8): p. 1539-43.
69. Fahlgren, A., et al., *Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**(1): p. 90-101.
70. Campieri, M. and P. Gionchetti, *Bacteria as the cause of ulcerative colitis*. Gut, 2001. **48**(1): p. 132-5.

71. Shanahan, F., *Physiological basis for novel drug therapies used to treat the inflammatory bowel diseases I. Pathophysiological basis and prospects for probiotic therapy in inflammatory bowel disease.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(3): p. G417-21.

8. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1:	Vom Gen zum fertigen Peptid [2]	(S. 5)
Abbildung 2:	Wege der Entzündung [35]	(S.10)
Abbildung 3:	T _H 1- und T _H 2- vermittelte Colitis [35]	(S.11)
Abbildung 4:	Real-Time-PCR Reaktion [51]	(S.20)
Abbildung 5:	PCR-Verlaufskurve und Standardgerade einer Real-Time-PCR	(S.21)
Abbildung 6:	GAPDH- Genexpression nicht entzündeter Biopsien der ersten 32 analysierten Patienten	(S.26)
Abbildung 7:	Cathelicidin-Genexpression in Colonmukosa von Patienten mit Morbus Crohn und von gesunden Patienten	(S.28)
Abbildung 8:	Cathelicidin-Genexpression in Colonmukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa und von gesunden Patienten	(S.28)
Abbildung 9:	CAMP-Expression in Ileumbiopsien von Morbus Crohn-Patienten aus Ileumschleimhaut von nicht entzündeten und entzündeten Biopsien sowie gesunden Probanden	(S.29)
Abbildung 10:	CAMP-Expression von makroskopisch entzündeten Ileumproben von Morbus Crohn-Patienten mit NOD2-Mutationen und gesunden Probanden	(S.30)
Abbildung 11:	CAMP-Expression von Colonbiopsien von makroskopisch nicht entzündeten und entzündeten Morbus Crohn-Patienten mit NOD2-Mutationen und gesunden Probanden	(S.31)
Abbildung 12:	Relative CD4-Genexpression in Biopsien von Morbus Crohn-Patienten	(S.32)
Abbildung 13:	Immunhistochemische Färbungen zum LL37-Peptid Nachweis in Colonbiopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	(S.34)

Danksagung:

Hiermit möchte ich mich für die freundliche und umfassende Unterstützung sowie für die aufgebrachte Geduld beim Team des Gastro-Labors der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Hr. Prof. Wolfgang Scheppach, Hr. Dr. Jürgen Schauber, Hr. Dr. Frank Weiler, Hr. Dr. Theodor Kudlich, Fr. Dr. Dorothee Rogoll, Fr. Antje Volk, Fr. Donata Dorbath.