

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Inhibition des nukleären Transkriptionsfaktors kappa B (NF- κ B)
durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat**

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

vorgelegt von
Tobias Ulrich Gerke
aus Porta Westfalica

Würzburg, März 2003

Referent: Prof. Dr. med. W. Scheppach

Korreferent: Prof. Dr. med. W. Timmermann

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 2004

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Colitis ulcerosa.....</i>	2
1.2	<i>Der nukleäre Faktor kappa B (NF-κB).....</i>	10
1.3	<i>Die kurzkettige Fettsäure Butyrat.....</i>	18
1.4	<i>Ziele der vorliegenden Untersuchung (Fragestellung).....</i>	23
2	Material und Methoden	25
2.1	<i>Zellkultur.....</i>	25
2.1.1	Zelllinien.....	25
2.1.2	Kulturbedingungen	26
2.1.3	Allgemeine Vorbereitung der Zellen	27
2.1.4	Zellstimulationsversuche zur Wirkung von Butyrat auf die nukleäre Translokation von NF-κB (p65).....	28
2.1.5	Zellstimulationsversuche zur Beeinflussung der IκBα-Phosphorylierung durch Butyrat	29
2.2	<i>Biopsien von Colitis ulcerosa-Patienten.....</i>	30
2.2.1	Studienaufbau	31
2.2.2	Entnahme der Biopsien.....	32
2.2.3	Aufarbeitung der Biopsien.....	32
2.2.4	Histologische Parameter	33
2.2.5	Klinischer Verlauf	34
2.2.6	Endoskopische Parameter	35
2.3	<i>Immunfluoreszenz/Immunhistochemie.....</i>	35
2.3.1	Immunfluoreszenzmarkierung von NF-κB (p65) an Zelllinien.....	35
2.3.2	Immunfluoreszenzmarkierung von NF-κB in Lamina propria-Makrophagen.....	37
2.3.3	Immunenzymatische Doppelfärbung von NF-κB (p65) und Lamina propria-Makrophagen (CD68) in Biopsien.....	38

2.4	<i>Western Blot</i>	39
2.4.1	Elektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.4.2	Blotting und Färbung	40
2.5	<i>Histologische/zytologische Färbungen</i>	42
2.5.1	Hämalaun-Eosin-Färbung	42
2.5.2	Hämalaun-Färbung	43
2.6	<i>Statistische Auswertung</i>	43
3	<i>Ergebnisse</i>	45
3.1	<i>Immunfluoreszenzfärbungen an Zelllinien</i>	45
3.1.1	Butyrat inhibiert die TNF α -induzierte Translokation von NF- κ B in HeLa 229-Zellen.....	45
3.1.2	Die IL-1 β -vermittelte Translokation von NF- κ B in HeLa 229-Zellen wird durch Butyrat gehemmt	50
3.1.3	Inhibition der NF- κ B-Translokation durch Butyrat in den kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480 und SW620.....	55
3.2	<i>Western Blot-Untersuchungen an Zelllinien</i>	57
3.2.1	Butyrat inhibiert in HeLa 229-Zellen die durch TNF α vermittelte Phosphorylierung des inhibitorischen I κ B α -Proteins.....	58
3.2.2	Butyrat hemmt die TNF α -induzierte Phosphorylierung von I κ B α in den Zelllinien SW480 und SW620	60
3.2.3	Butyrat inhibiert nicht die IL-1 β -vermittelte I κ B α -Phosphorylierung in der Zelllinie HeLa 229	63
3.3	<i>Untersuchungen an Biopsien von Patienten mit aktiver distaler Colitis ulcerosa</i>	65
3.3.1	Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in Lamina propria-Makrophagen durch die topische Behandlung mit Butyrat	65
3.3.2	Disease Activity Index	69
3.3.3	Endoskopie-Score	71
3.3.4	Histologischer Score	72
3.4	<i>Beantwortung der Fragen</i>	74

4	Diskussion	80
4.1	<i>Allgemein</i>	81
4.2	<i>Hemmung der TNFα-vermittelten NF-κB-Translokation</i>	93
4.3	<i>Inhibition der IL-1β-vermittelten NF-κB-Translokation</i>	97
4.4	<i>Hemmung von NF-κB in Lamina propria-Makrophagen</i>	100
4.5	<i>Schlußfolgerung und Ausblick</i>	103
5	Zusammenfassung	106
6	Literatur	110
7	Anhang	135
7.1	<i>Zellkulturmedien</i>	135
7.2	<i>Biopsien</i>	135
7.3	<i>Immunhistochemie / Immunfluoreszenz</i>	138
7.4	<i>Western Blot</i>	141

Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalizylsäure
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Antigen-Präsentierende Zelle
BSA	Bovine Specific Albumine
CD	Cluster of Differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CU	Colitis ulcerosa
DAI	Disease Activity Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENA-78	Epithelial cell derived Neutrophil Activator-78
GRE	Glukokortikoid Response Element
IEC	Intestinale Epithelzellen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I κ B	Inhibitory kappa B
IKK	I κ B-Kinase
KKFS	Kurzketttige Fettsäure(n)
LPMNC	Lamina propria-Makrophagen
LPS	Lipopolysaccharid
MAP3K	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEKK1	MAP/ERK kinase kinase
MC	Morbus Crohn
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NEMO	NF- κ B essential Modulator
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NIK	NF- κ B-inducing Kinase
NLS	Nuclear Location Sequence
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	Phosphate Buffered Saline
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll Like Receptor
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor

1 Einleitung

Bei der Colitis ulcerosa (CU) handelt es sich um eine weltweit vorkommende Erkrankung der Rektum- und Dickdarmschleimhaut, die neben dem Morbus Crohn (MC) zur Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gezählt wird. Trotz intensiver Bemühungen und deutlicher Fortschritte in der Pathogeneseforschung ist die genaue Ursache für die Entstehung der CU noch weitgehend unbekannt. In mehreren Studien konnte diesbezüglich gezeigt werden, daß neben Umwelt- und genetischen Faktoren insbesondere auch eine Veränderung des intestinalen Immunsystems eine große Rolle zu spielen scheint [106]. Die in diesem Zusammenhang mögliche Bedeutung der ortsständigen Makrophagen in der Lamina propria sowie der von ihnen sezernierten Zytokine konnte ebenfalls durch Untersuchungen belegt werden [108, 150].

Eine Schlüsselfunktion im Rahmen entzündlicher Prozesse nimmt der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B) ein [12]. Dieser aus mehreren Untereinheiten bestehende Transkriptionsfaktor reguliert durch Bindung im Bereich der jeweiligen Promotorregionen die Aktivität von proinflammatorischen Zytokinen, Zelloberflächenrezeptoren, Adhäsionsmolekülen sowie anderen Transkriptionsfaktoren. Die Aktivierung von NF- κ B bei Patienten mit einer CED [175], insbesondere in intestinalen Epithelzellen (IEC) und Lamina propria-Makrophagen (LPMNC) [150], läßt diesen Transkriptionsfaktor als möglichen und auch attraktiven Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen erscheinen.

Im menschlichen Dickdarm entstehen durch die bakterielle Fermentation von nichtspaltbaren Kohlenhydraten kurzkettige Fettsäuren (KKFS) [76].

Diese dienen den Kolonepithelien als Hauptenergieträger [146] und haben neben antiproliferativen, differenzierungssteigernden und apoptoseinduzierenden Effekten auf Tumorzellen [208] auch ausgeprägte antiinflammatorische Eigenschaften. So konnte in mehreren kontrollierten [23, 165, 168, 184, 192, 210] und unkontrollierten [22, 137, 191, 209] klinischen Untersuchungen für die topische Behandlung der CU, der Diversionskolitis [71] sowie der Strahlenproktitis [3, 211] mit KKFS (hier insbesondere Butyrat) eine deutliche Reduktion der Entzündungsaktivität nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang konnten Inan et al. für die Inkubation von Kolonkarzinomzellen mit Butyrat eine effektive Hemmung der NF- κ B-Translokation nachweisen [81].

1.1 Colitis ulcerosa

Die CU wurde erstmals 1875 von Wilks und Moxon als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben. Sie stellt mit einer jährlichen Inzidenz von 1,5 - 25 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und einer Prävalenz von 80 – 157 Erkrankten pro 100000 Einwohner ein zunehmend relevantes Krankheitsbild dar [79]. Die auffällig großen Schwankungen der Inzidenz lassen sich durch unterschiedliche geographische, ethnische sowie Zeitfaktoren in den jeweiligen Studien erklären. Insgesamt ist die CU in Nord-europa häufiger zu finden mit ca. 1,4fach höheren Inzidenzwerten in den skandinavischen Ländern und Schottland verglichen mit Südeuropa [185]. Die Wahrscheinlichkeit, an einer CU zu erkranken, ist bei Stadtbewohnern, Angehörigen höherer Schichten und Einwohnern von Industriestaaten

ebenfalls deutlich erhöht gegenüber der Landbevölkerung, Mitgliedern niedrigerer sozioökonomischer Klassen bzw. Einwohnern von Entwicklungsländern [131].

Die CU ist durch eine auf Mukosa und Submukosa beschränkte chronisch rezidivierende Entzündung gekennzeichnet, die sich vom Rektum ausgehend kontinuierlich von aboral nach oral in variabler Länge auf den Dickdarm ausweiten kann. In bis zu 80 % der Fälle ist das gesamte Kolon betroffen [6, 53]. Bei ca. 10 – 20 % dieser Patienten mit einer Pankolitis kann zusätzlich eine Mitbeteiligung des terminalen Ileums von unterschiedlicher Länge beobachtet werden (sog. retrograde oder Backwash-Ileitis) [133]. Makroskopisch erscheint die kolorektale Schleimhaut dabei matt, samtartig und leicht granuliert. Sie ist hyperämisch, ödematös aufgequollen und sehr kontaktvulnerabel [48, 53, 133]. Zunächst entwickeln sich verteilte punktförmige oberflächliche Schleimhauterosionen, später unregelmäßige, z. T. schmierig belegte longitudinale Ulzerationen. Diese unterminieren oft buchtenartig die Schleimhaut und führen in Kombination mit gesteigerten Regenerationsvorgängen zur Ausbildung von sog. Pseudopolypen [6, 53, 193]. Im Verlauf der CU imponieren eine atrophische blasse Schleimhaut, aufgehobene Haustrierung und Transformation des Darms in einen starren, evtl. auch stenosierten und verkürzten „Schlauch“ [48, 53, 133, 193]. In Phasen der Remission können sich die koloskopisch erhobenen Befunde weitgehend normalisieren, im allgemeinen aber findet man Residuen einer abgelaufenen oder wenig aktiven Entzündung [53, 193].

Die histologischen Gegebenheiten der CU sind relativ unspezifisch. Das entzündliche Infiltrat ist durch Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie einige Mastzellen gekennzeichnet. Es bleibt überwiegend auf Mukosa und Submukosa beschränkt, tiefere Wandschichten sind nur bei fulminanten Verläufen betrof-

fen [133]. In der Kryptenumgebung und den Kryptenlumina finden sich zahlreiche neutrophile Granulozyten, assoziiert mit einer Kryptendestruktion (Kryptitis, später Kryptenabszesse). Einzig charakteristisch, jedoch nicht spezifisch für die CU ist eine gestörte Architektur der Krypten (unregelmäßige Anordnung, Verzweigungen) mit einem Verlust schleimbildender Becherzellen [48, 133].

Das Kardinalsymptom der CU ist die schleimig-blutige Diarrhoe, die mit einer Frequenz von bis zu 20 pro Tag auftreten kann. Das Blut ist dem Stuhl aufgelagert oder beigemengt, insbesondere bei schweren Krankheitsschüben wird häufig auch reines Blut abgesetzt. Es bestehen häufige, tenesmenartige Entleerungen geringer Stuhlmengen. Bei der körperlichen Untersuchung können ein reduzierter Allgemeinzustand, Exsikkose, Fieber, Zeichen der Anämie oder Ödeme als Hinweise auf einen Eiweißmangel auffallen [152]. Das Abdomen kann gespannt, meteoristisch und lokal oder diffus druckschmerzhaft sein. Das Blutbild und die klinische Chemie geben meistens Hinweise auf eine chronisch verlaufende entzündliche Erkrankung [6, 53, 123].

Als Komplikationen der CU sind neben extraintestinalen Manifestationen an Haut (Erythema nodosum), Gelenken (Arthritis, Spondylitis ankylosans) oder Augen (Uveitis, Episkleritis) auch Wachstumsstörungen (im Kindesalter) und Gewichtsverlust bis zu anorexieartigen Zuständen zu nennen [53, 152]. Eine besondere Position nimmt jedoch das toxische Megakolon ein, von dem im Verlauf ca. 5 % der Erkrankten betroffen sind und in dessen Gefolge gehäuft eine Darmperforation mit Peritonitis und Sepsis beobachtet werden kann [152]. Insbesondere bei langjährigen Verläufen kann es durch die permanente Entzündungsreaktion zur Ausbildung von narbigen Strikturen mit Verlust der Haustrierung kommen. Diese treten jedoch nur sporadisch auf, so daß differentialdiagnostisch bis zum Beweis des Gegenteils

immer auch an das Vorliegen eines Kolonkarzinoms gedacht werden muß [141, 152].

Die CU an sich gilt als Krebsrisikoerkrankung mit einer, im Gegensatz zum MC, relativ klar definierten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms [18, 190]. So gilt es als weitgehend gesichert, daß sowohl Aktivität und Dauer als auch Ausdehnung der Erkrankung die wesentlichen Risikofaktoren darstellen [64, 93, 141]. Bei der Pankolitis steigt die Wahrscheinlichkeit der Karzinomentwicklung nach 8 - 10 Krankheitsjahren um ca. 1 % pro weiterem Jahr an [51, 64]. Das relative Karzinomrisiko bei der CU in Bezug zur Vergleichspopulation ist ca. 20fach erhöht [152]. Als zusätzlicher Risikoindikator wird die Assoziation mit einer primär-sklerosierenden Cholangitis (PSC) angesehen, die bei 2 - 5 % der Patienten auftritt [64, 93, 190]. Interessanterweise gilt für die Karzinogenese bei der CU nicht die übliche Adenom-Karzinom-Sequenz. Die Tumoren entwickeln sich vielmehr aus flachen Schleimhautarealen über die Vorstufen von niedrig- bzw. hochgradigen Epitheldysplasien [193, 213]. Da diese als präkanzeröse Läsionen angesehen werden können, gilt der endoskopisch/histologische Nachweis von Dysplasien als wichtigster Marker für die Vorsorge [141, 190].

Trotz deutlicher Fortschritte in der Pathogeneseforschung sind die auslösenden Faktoren der CU noch nicht eindeutig identifiziert. Derzeit wird am ehesten von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen, bei dem sowohl genetische, infektiöse als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Auffällige psychische Züge und die stark affektive Färbung des Krankheitsverlaufes lassen an psychosomatische Zusammenhänge denken, jedoch weniger in Form der Krankheitsauslösung als vielmehr der Krankheitsausprägung [55].

Die mögliche Bedeutung von genetischen Faktoren in der Ätiologie der CED konnte durch mehrere Untersuchungen nachgewiesen werden. So findet man bei ca. 10 – 20 % der Erkrankten eine deutliche familiäre Häufung [47, 138], wobei innerhalb derselben Familie sowohl Fälle von CU als auch von MC auftreten können [126]. Verwandte ersten Grades haben gegenüber der Normalbevölkerung ein insgesamt 10 - 15fach erhöhtes Risiko zu erkranken [138]. Aus Zwillingsstudien ergeben sich deutliche Hinweise, daß nicht allein genetische, sondern auch Umweltfaktoren für das Auftreten einer CED vorhanden sein müssen [138, 201]. Ebenso scheinen neben der Einnahme von oralen Kontrazeptiva, Antibiotika und nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) auch der zunehmende Hygienestatus in den Industrieländern sowie seltener gewordenes Stillen eine gewisse Rolle zu spielen [47, 126, 142]. Ferner wurden eine fett- und kohlenhydratreiche sowie ballaststoffarme Ernährung mit für die Entstehung der CED verantwortlich gemacht [47, 126]. Der bislang am besten untersuchte sowie eindeutig belegte Faktor ist das Zigarettenrauchen [202]. Bei der CU läßt sich interessanterweise ein protektiver Effekt durch Nikotin feststellen, wohingegen bei Rauchern mit MC eher aggressivere Krankheitsverläufe beobachtet werden können [14, 37].

Eine Evidenz für die Hypothese etwaiger infektiöser Faktoren, insbesondere für die in den letzten Jahrzehnten postulierten Infektionen mit Masern- bzw. Mumpsviren, Mycobacterium paratuberculosis oder Listeria monocytogenes, konnte bislang nicht erbracht werden [126, 161]. Unumstritten ist jedoch die Bedeutung eines bislang noch unbekanntes luminalen (bakteriellen?) Antigens. Hierfür sprechen die in Darmarealen mit dichter Bakterienbesiedelung (terminales Ileum, Kolon) oftmals ausgeprägtere Manifestation und die Besserung der Erkrankung auf Antibiotikagabe. In diesem Zusammenhang erscheint ebenfalls die Inaktivität der Erkrankung in ausgeschalte-

ten Darmabschnitten sowie das Auftreten von Rezidiven nach Wiederherstellung der Stuhlpassage interessant [126]. D'Haens et al. konnten zeigen, daß sich in ruhiggestellten Darmarealen nach Infusion von Darminhalt aus betroffenen Anteilen innerhalb von wenigen Tagen ein histologisches Rezidiv des MC ausbildet [45]. Diese Daten belegen zwar nicht die Existenz eines bakteriellen Antigens, sie legen jedoch nahe, daß es möglicherweise Bestandteile des Darminhaltes sind, welche die Krankheit auslösen: „The enemy is within the fecal stream“ [162].

Unter den zahlreichen, teilweise auch konträren Vorstellungen zur Krankheitsentwicklung rückt insbesondere das Konzept einer Alteration des lokalen intestinalen Immunsystems zunehmend in den Mittelpunkt [106, 126, 161]. So kann die charakteristische Entzündung der Mukosa und Submukosa im Rahmen der CU, bei bestehender Prädisposition, als Höhepunkt einer Kaskade von Ereignissen verstanden werden [106, 136, 161]. Hierbei spielen insbesondere die LPMNC eine bedeutende Rolle, die an Stellen mikrobieller Invasion oder im Bereich von Schleimhautverletzungen in großer Anzahl in den subepithelialen Anteilen der Lamina propria gefunden werden können [108, 150]. Sie interagieren direkt mit Mikroorganismen, fungieren als klassische Antigen-präsentierende Zellen (APC) [1] oder greifen durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen [124] als „Verstärker“ der mukosalen Immunantwort in das Entzündungsgeschehen ein. Voraussetzung hierfür ist jedoch zunächst ihre Aktivierung [150] durch von T-Zellen ausgeschüttetes Interferon-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) [1], von IEC sezernierten Tumor Nekrose Faktor-alpha ($\text{TNF}\alpha$) [86] oder aber direkt durch bakterielle Zellwandbestandteile (Lipopolysaccharid, LPS) [206]. Die aktivierten LPMNC sezernieren daraufhin die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, Interleukin-1-beta ($\text{IL-1}\beta$) und IL-6 [124, 127, 195] sowie die Chemokine IL-10 , IL-12 und IL-18 [105, 149]. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ stimulie-

ren Epithelzellen, Endothelzellen und, im Rahmen eines autokrinen Mechanismus, Makrophagen zur weiteren Ausschüttung von Zytokinen sowie des Neutrophilenaktivators und Chemotaxins IL-8 [118], ebenso wie von Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Epithelial Cell Derived Neutrophil Activator-78 (ENA-78) [113], wobei die beiden letzteren bei der CU eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen [105].

Neben den LPMNC sind auch die IEC in die mukosale Immunantwort eingebunden [150]. Die derzeitige Datenlage deutet dabei auf drei mögliche Wege ihrer Beteiligung hin: (1) durch Erhöhung der Permeabilität und Intensivierung der Antigenabsorption [58, 225]; (2) als Entzündungsvermittler über die Ausschüttung von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen [86, 87]; (3) als „untypische“ Antigen-präsentierende Zellen (APC) [112]. So wird im Rahmen der normalen LPMNC-Funktion als APC ein aufgenommenes Antigen prozessiert, zusammen mit dem Major Histocompatibility Complex II (MHC II) angeboten und von T-Zellen an deren T-Zell-Rezeptor (TCR), gemeinsam mit einem Co-Signal aus B7 (APC) und CD28 (T-Zelle), gebunden [108, 160]. Die endgültige Antwort auf den Antigenkontakt hängt dann aber davon ab, ob es sich um eine klassische oder nicht-klassische APC (wie z. B. IEC) handelt. In gesunden Individuen würde der Antigen-Präsentation durch Enterozyten eine T-Zell-Toleranz folgen, nicht jedoch bei Patienten mit einer CED. Hier kommt es im Gefolge zu einer deutlich gesteigerten Immunantwort [112].

Die derzeitige Standardtherapie der CU wird entsprechend der klinischen Einteilung durchgeführt und unterscheidet die Behandlung eines unkomplizierten Schubes, einer fulminanten Kolitis, einer chronisch aktiven Kolitis sowie einer Kolitis in Remission [64, 172, 193].

Zur Therapie des unkomplizierten Schubes haben sich 5-Aminosalizylsäure-freisetzende Präparate bewährt, bei deren Versagen gegebenenfalls auf Glukokortikoide (Hydrocortison, Prednisolon) zurückgegriffen werden kann. Zur Anwendung kommen dabei insbesondere topisch wirkende Präparationen wie Suppositorien (Proktitis), Einläufe oder Rektalschäume (linksseitige Kolitis). Kommt es zu einer ausgedehnten Kolitis über die linke Kolonflexur hinaus, empfiehlt sich die systemische Therapie mit oraler Gabe von 5-Aminosalizylsäure (5-ASA) oder bei deren Versagen von Glukokortikoiden [6, 160, 172].

Die fulminante Kolitis mit mehr als 15 - 20 Stühlen pro Tag sowie ausgeprägten Blutverlusten wird bereits primär mit Steroiden behandelt [172]. Sprechen die Patienten nicht innerhalb weniger Tage darauf an, ist über eine Kolektomie oder aber alternativ die Gabe von Cyclosporin-A nachzudenken, welches bei der Mehrzahl der therapierten Patienten zu einer deutlichen Reduktion der Krankheitsaktivität führte [103, 123].

Aufgrund der hohen Rezidivrate der CU spielt insbesondere die Remissionserhaltung eine bedeutende Rolle. Zu diesem Zweck kommen ebenfalls 5-ASA-haltige Präparate zum Einsatz, deren orale Gabe zu einer deutlichen Verminderung des Rezidivrisikos führt [110]. Interessanterweise lassen sich dabei zwischen den einzelnen 5-ASA-Präparaten keine relevanten Unterschiede finden [197]. Mehrere Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, daß eine längerfristige Remissionserhaltung mit 5-ASA-freisetzenden Präparaten als Nebeneffekt das Risiko für ein Kolonkarzinom bei CU-Patienten deutlich vermindern kann [50, 119]. Durch Studien validiert, scheint auch die Gabe von E. coli-Präparationen ähnlich wirksam zu sein wie die von 5-ASA [95].

Wird zum einen weder mit 5-ASA noch mit Glukokortikoiden eine Remission erzielt oder besteht zum anderen eine ausgeprägte Steroidabhängigkeit,

kann auch mit dem Immunsuppressivum 6-Mercaptopurin oder seiner Vorstufe Azathioprin behandelt werden [62, 160].

1.2 Der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B)

Die Antwort von Zellen auf extrazelluläre Stimuli erfordert häufig Veränderungen in der Genexpression. Dies geschieht durch Regulation der Genaktivität über sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren [200]. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B), der 1986 zunächst als Aktivator des Immunglobulin κ -Leichtketten-Gens entdeckt wurde [183]. Relativ bald stellte sich jedoch heraus, daß NF- κ B ubiquitär in nahezu allen Zellen vorkommt und als schnell aktivierbarer Regulator verschiedener biologischer Abwehrprozesse, z. B. im Rahmen der Antwort auf proinflammatorische Stimuli, erforderlich ist [12]. NF- κ B verändert durch seine Bindung im Bereich der jeweiligen Promotorregionen die Transkription etlicher Gene für Zytokine/Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Immunregulatoren, Faktoren der Apoptose, Akute Phase-Proteine, Enzyme, Transkriptionsfaktoren etc. [134]. Einen Überblick hierzu gibt die Tabelle auf der folgenden Seite (*Tab. 1*).

Der nukleäre Faktor κ B ist letztlich als eine Art Oberbegriff zu verstehen, der eine heterogene Gruppe eukaryontischer Transkriptionsfaktoren umschreibt. Diese setzt sich aus Proteinen der Rel-Familie zusammen (*Abb. 1*), von der in Säugetieren bis heute fünf Mitglieder näher charakterisiert werden konnten. Dabei handelt es sich um NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52),

RelA (p65), RelB und c-Rel. Analog hierzu wurden in *Drosophila melanogaster* die Proteine *dorsal*, *dif*, und *relish* identifiziert [7, 63]. Allen aufgeführten Proteinen gemeinsam ist die sog. Rel-Domäne, eine Sequenzhomologie innerhalb der N-terminalen 300 Aminosäuren (*Abb. 1*). Diese Region

Tab. 1: Exemplarische Auswahl von Zielgenen, die einer transkriptionellen Regulation durch NF- κ B unterliegen (modifiziert nach [134]).

Zytokine und Wachstumsfaktoren	IL-1 α und - β	IL-2, -3, -6, -8 und -12	
	TNF α und - β	G-CSF	M-CSF
	GM-CSF	β -Interferon	Eotaxin
	Lymphotoxin α und - β	PDGF	
Adhäsionsmoleküle	ICAM-1	VCAM-1	ELAM-1
	P-Selectin	E-Selectin	Mad-CAM-1
Faktoren der Apoptose	Bcl-xL	TRAF1	TRAF2
	Fas (cCD95)	Fas-Ligand	
Transkriptionsfaktoren	NF- κ B1, NF- κ B2	RelA,	I κ B α
	c-Rel	c- <i>myc</i>	p53
Immunregulatoren	Ig κ -Leichtkette	MHC I und II	TCR α und - β
	β 2-Microglobulin		
Stressproteine	α 1-Antitrypsin	Komplementfaktor C3 und C4	
	Serum-Amyloid A	Angiotensin II	
Enzyme	iNOS	5-Lipoxygenase	COX-2
	Phospholipase A2	Collagenase 1	

G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; M-CSF, macrophage colony stimulating-factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; PDGF, platelet derived growth factor; ICAM, intercellular adhesion molecule; VCAM, vascular-cell adhesion molecule; ELAM, endothelial leukocyte adhesion molecule; MAd-CAM-1, mucosal vascular addressing cell adhesion molecule; TRAF, TNF-receptor associated factor; MHC, major histocompatibility complex; TCR, T-cell receptor; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX, Cyclooxygenase.

enthält die funktionellen Anteile, welche für die Bildung von Dimeren, die Interaktion mit inhibitorischen Proteinen, die nukleäre Translokation (via Nuclear Location Sequence, NLS) und die Bindung an die DNA verantwortlich sind [9, 63]. Strukturell lassen sich zwei Gruppen von Rel-Proteinen unterscheiden. Die erste besteht aus NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2

(p52), die jeweils durch limitierte proteolytische Prozessierung aus den zunächst gebildeten Precursor-Proteinen p105 bzw. p100 hervorgehen (*Abb. 1*) [52, 63, 135]. Alle Angehörigen der zweiten Gruppe, RelA (p65), RelB und c-Rel, werden als reife Proteine synthetisiert [63]. Die Mitglieder der Rel-Familie können sich zu beliebigen Dimeren formieren mit Ausnahme von RelB, welches nur Heterodimere mit p50 und p52 bildet [155].

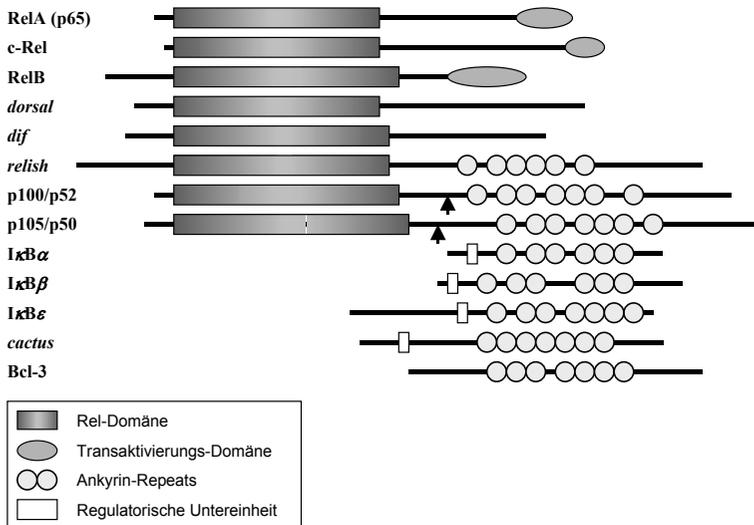


Abb. 1: Mitglieder der NF- κ B/Rel- und I κ B-Proteinfamilie (modifiziert nach [9, 63]). Die Pfeile (\blacktriangle) kennzeichnen den Bereich der proteolytischen Spaltung der Precursor-Proteine p100 und p105.

Homodimere aus p50 oder p52 haben inhibitorische Funktionen, wohingegen RelA-, RelB- oder c-Rel-enthaltende Komplexe aufgrund ihrer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (*Abb. 1*) als Aktivatoren der Transkription wirken [171]. Die klassische und zugleich auch häufigste Form des NF- κ B-

Dimers besteht aus jeweils einer p50- sowie einer p65-Untereinheit und agiert als potenter Aktivator der Genexpression [9].

In unstimulierten Zellen findet man NF- κ B zytoplasmatisch gebunden im Komplex mit inhibitorisch wirkenden Proteinen (*Abb. 2*). Zur Familie dieser Inhibitoren gehören neben I κ B α , I κ B β , I κ B γ und I κ B ϵ auch Bcl-3, p100, p105 sowie das *Drosophila*-Protein *cactus* [9, 63]. Alle diese Proteine enthalten 6 oder 7 N-terminale Ankyrin-Repeats, die letztlich für die Bindung an die Rel-Domäne verantwortlich sind (*Abb. 1*). Daten zur dreidimensionalen Struktur des I κ B α /NF- κ B-Komplexes zeigen den N-Terminus von I κ B α in direktem Kontakt zur NLS, was deren Bindung an Carrier-Proteine (sog. Karyophorine) und somit die Translokation von NF- κ B in den Zellkern verhindert [80, 82]. Um dennoch an den Wirkort, die DNA, zu gelangen, ist die Lösung von NF- κ B aus diesem Komplex erforderlich; dies erfolgt über eine relativ energieaufwendige aber schnelle Degradierung von I κ B (*Abb. 2*). Hierfür befindet sich in einigen I κ B-Proteinen (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ und *cactus*) neben den Ankyrin-Repeats noch eine N-terminal gelegene regulatorische Untereinheit (*Abb. 1*) [9]. Diese enthält zwei essentielle Serinreste (Serin 32 und 36 in I κ B α , Serin 19 und 23 in I κ B β), die durch einen auf die Zelle einwirkenden proinflammatorischen Stimulus wie TNF α , IL-1 β oder LPS phosphoryliert werden (*Abb. 2*) [25, 204]. Anschließend erfolgt eine Polyubiquitination der I κ B-Moleküle (*Abb. 2*) an ein oder zwei ebenfalls in der regulatorischen Untereinheit gelegenen Lysinresten durch die E3^{I κ B}-Untereinheit des Ubiquitin-Ligase-Komplexes [170, 227]. Die Verknüpfung mit den Ubiquitin-Molekülen markiert das I κ B-Protein für die nachfolgende Degradierung durch das 26S-Proteosom (*Abb. 2*) [2, 135, 179]. Im Rahmen dieser Degradierung wird die NLS von NF- κ B demaskiert und eine Translokation in den Zellkern möglich.

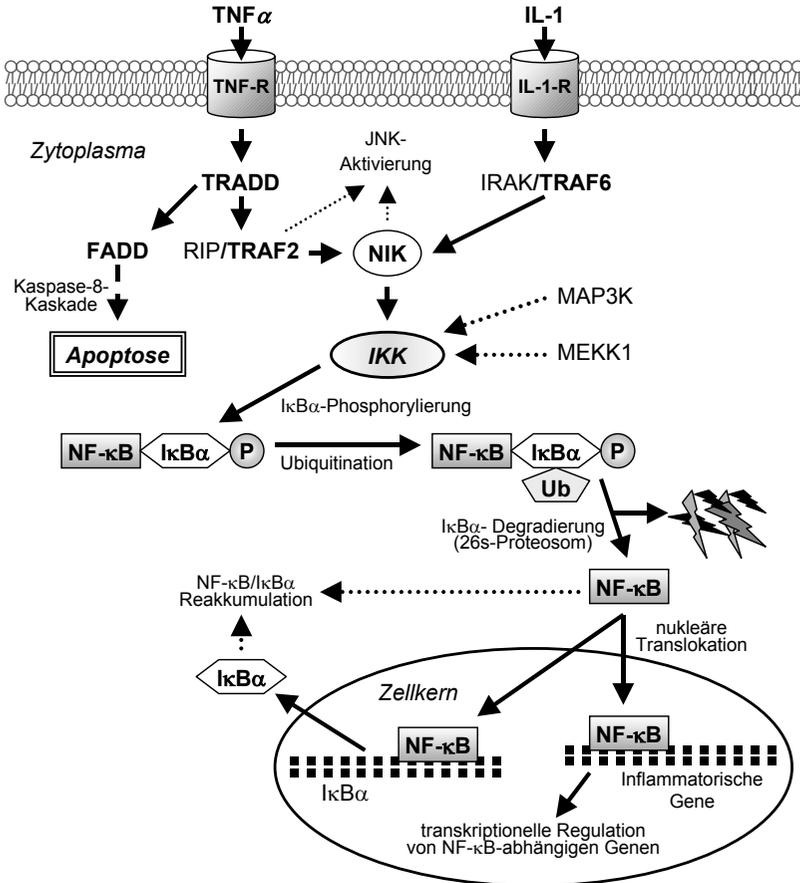


Abb. 2: Schematische Darstellung der NF- κ B-Signaltransduktionskaskade (modifiziert nach [139, 173]). FADD, Fas-associated death domain; IRAK, IL receptor-associated kinase; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; RIP, Receptor-interacting protein; TRAF, TNF-receptor associated factor; TRADD, TNF receptor-associated death domain.

Den eigentlichen Schlüsselschritt in der NF- κ B-Aktivierung stellt jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand die Phosphorylierung von I κ B dar (Abb. 2). Als verantwortliches Enzym konnte 1996 ein aus mehreren Untereinheiten

bestehender Kinasenkomplex (MG ca. 700 – 900 kD) identifiziert werden: die I kappa B-Kinase (IKK) [46, 117]. Definiert wurde sie einerseits über ihre Fähigkeit, spezifisch die N-terminalen regulatorischen Serinreste von I κ B zu phosphorylieren, andererseits über ihre schnelle Aktivierbarkeit durch proinflammatorische Stimuli [46, 117]. Durch differenzierte Untersuchungen konnten bislang drei IKK-Untereinheiten näher charakterisiert werden. Zum einen zwei katalytisch wirkende, IKK α (IKK-1) und IKK β (IKK-2), zum anderen eine regulatorische Untereinheit IKK γ (NEMO, NF- κ B essential modulator) [46, 117, 153, 231]. Voll aktive IKK-Komplexe enthalten Heterodimere von IKK α und IKK β sowie ein oder mehrere Moleküle IKK γ [153, 231]. Sie zeigen eine leichte Bevorzugung für I κ B α gegenüber I κ B β , was evtl. die etwas schnellere Degradierung von I κ B α erklären könnte. Zusätzlich handelt es sich bei NF- κ B-gebundenem I κ B α und I κ B β um wesentlich bessere Substrate der IKK als bei ihren freien Formen; dadurch ist u. a. die Akkumulation von neu synthetisiertem I κ B α im Zytoplasma erklärt [230]. Diese spielt letztlich auch bei der Terminierung der NF- κ B-Aktivierung und beim Rücktransport von NF- κ B-Molekülen aus dem Kern eine bedeutende Rolle [4], zumal sich eine transiente und eine persistierende Art der NF- κ B-Aktivierung unterscheiden lassen [199, 205]. Darüber hinaus existieren Hinweise, daß IKK α und IKK β im Rahmen ihrer Aktivierung selbst durch zwei Upstream-Kinasen der Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase-Familie (MAP3K), NF- κ B-inducing Kinase (NIK) und MAPK/ERK Kinase Kinase-1 (MEKK1), phosphoryliert werden können (*Abb. 2*) [109, 123].

Der zuvor dargestellte universelle Aktivierungsmechanismus (vgl. *Abb. 2*) ist auf nahezu alle Aktivatoren von NF- κ B anwendbar. Derzeit gibt es nur zwei bekannte Ausnahmen: die zelluläre Antwort auf Hypoxie/Anoxie bzw.

kurzwellige UV-Strahlung (UV-C). Durch Hypoxie/Anoxie wird die Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ an Tyrosin 42 durch eine bislang unbekannt Kinase stimuliert [187]. Die darauf folgende Degradierung erfolgt durch Interaktion mit der Phosphatidyinositol 3-Kinase (PI3-K), das 26s-Proteosom bleibt unbeteiligt [17]. Bei der Aktivierung von NF- κ B durch UV-C-Strahlung kommt es zwar zur Degradierung von $I\kappa B\alpha$, diese erfordert jedoch nicht die vorherige Phosphorylierung an Serin 32 bzw. 36 [16]. Dementsprechend kann auch durch die Expression einer katalytisch inaktiven IKK β -Mutante die NF- κ B-Aktivierung nicht verhindert werden [102]. Gemeinsam ist beiden alternativen Wegen die deutlich langsamere Aktivierung von NF- κ B als dies z. B. bei den klassischen Aktivatoren TNF α , IL-1 β oder LPS der Fall ist.

Die Aktivierung der NF- κ B-Kaskade kann letztlich über zahlreiche unterschiedliche Wege erfolgen. Was diese Kaskade auszeichnet ist ihre hohe Geschwindigkeit, die sie insbesondere für die Signaltransduktion von proinflammatorischen Reizen wie u. a. Zytokine, T- und B-Zell-Mitogene, Bakterien, Viren, virale Proteine sowie physischen und chemischen Stress prädestiniert (*Tab. 2*). Unglücklicherweise wirken viele der NF- κ B-Aktivatoren auch über andere Signalwege, was es deutlich erschwert, die frühen Geschehnisse in der Zelle eindeutig dem NF- κ B-Signalweg zuzuordnen.

Die mögliche Bedeutung der Aktivierung von NF- κ B auch im Rahmen der CED [175], speziell jedoch der CU, läßt sich bereits aus der zentralen Rolle von NF- κ B im Entzündungsgeschehen [12] ableiten. So konnte in ersten Studien eine Aktivierung von NF- κ B bei der 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)-induzierten Kolitis in Mäusen nachgewiesen werden. Neurath et al. beschrieben in diesem Zusammenhang eine erhöhte DNA-Bindungs-

Aktivität von NF- κ B-Komplexen (p65/p50) in Kernextrakten von Lamina propria-Makrophagen [127]. Nachdem insbesondere p65 und nicht p50 die transkriptionelle Aktivierung von proinflammatorischen Genen vermittelt,

Tab. 2: Exemplarische Auswahl von Aktivatoren der NF- κ B-Signaltransduktionskaskade (modifiziert nach [134]).

Zytokine und Wachstumsfaktoren	IL-1 α	IL-1 β	TNF α
	TNF β	IL-17	M-CSF
	Leukotrien B4	PDGF	
Bakterien und bakterielle Produkte	LPS	TSST-1	Exotoxin B
	EPEC	Helicobacter pylori	Salmonellen
	Shigellen		
Oxidantien	Ozon	Wasserstoffperoxid	Radikale
Viren	HIV-1	HTLV-1	Hepatitis B-Virus
	HSV-1	Rhinovirus	EBV
	Influenzavirus	CMV	Adenovirus
Sonstige	UV-Strahlung	Röntgenstrahlung	γ -Strahlung

LPS, Lipopolysaccharid; TSST, Toxischer-Schock-Syndrom-Toxine; EPEC, Enteropathogene E. coli; HSV, Herpes-simplex-Virus; EBV, Epstein-Barr-Virus; CMV, Zytomegalievirus; PAF, platelet activating factor

wurde in dieser Studie die Wirkung spezifischer p65-Antisense-Oligonukleotide getestet. Hierbei konnte eine spezifische und dosisabhängige Herabregulation der Menge von p65-mRNA und p65-Protein beobachtet werden, ebenso wie eine deutlich reduzierte Sekretion der NF- κ B-abhängigen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α [127]. Rogler et al. konnten in diesem Zusammenhang eine Aktivierung von NF- κ B in Lamina propria-Makrophagen aufzeigen, ebenso wie in intestinalen Epithelzellen aus Biopsien von Patienten mit einer CED [150].

1.3 Die kurzkettige Fettsäure Butyrat

Die bakterielle Mikroflora des menschlichen Dickdarms besteht aus ca. $10^{13} - 10^{14}$ koloniebildenden Einheiten, wobei deren Anzahl, Fermentationsaktivität und Proliferationsverhalten eine deutliche Abhängigkeit vom Nährstoffangebot zeigen [76, 107]. Die hierbei dominierenden Mikroorganismen sind Anaerobier wie z. B. Bakteroidesstämme (mit mehr als 30 % die bedeutendste Spezies), Eubakterien, Peptostreptokokken, Laktobazillen und Bifidobakterien [77]. Sie sind in der Lage, durch Fermentation von komplexen Kohlenhydraten Energie für ihren Metabolismus und ihr Wachstum zu gewinnen. Diese Stoffwechselprozesse spielen jedoch nicht nur für die Bakterien selbst eine bedeutende Rolle, auch der jeweilige Wirtsorganismus ist in unterschiedlicher Weise davon abhängig [26, 224]. So beziehen z. B. Wiederkäuer ca. 70 – 80 % ihres täglichen Energiebedarfes aus kurzkettigen Fettsäuren (KKFS), welche über die bakterielle Degradation von resistenter Stärke in ihren Vormägen gebildet werden [121]. Auch beim Menschen ist die fermentative Funktion der anaeroben Mikroflora eine unerläßliche Komponente der normalen Dickdarmfunktion, auch wenn sie hier nicht diese überragende Position in der Energiegewinnung für den Körper einnimmt (weniger als 5 – 10 % des täglichen Energiebedarfs werden so abgedeckt) [130]. Im Vordergrund steht vielmehr die Bereitstellung von KKFS als Hauptenergieträger der Kolonepithelzellen [32, 33, 154].

Ungefähr 20 % der mit der Nahrung aufgenommenen Stärke entgehen bei einer durchschnittlichen westlichen Ernährungsform (fettreich, ballaststoffarm) der Verdauung im Dünndarm und gelangen als resistente Stärke in den Dickdarm [36, 194]. Hier werden diese komplexen Kohlenhydrate pflanzlichen Ursprungs, die größtenteils aus Zellulose, Hemizellulose, Dextranen

und Pektinen bestehen, als Hauptsubstrate der bakteriellen Mikroflora weiter aufgespalten [38, 39]. Die Endprodukte dieses Vorganges sind zum einen die quantitativ am bedeutsamsten KKFS mit einer täglich produzierten Gesamtmenge von ca. 200 – 400 mmol, zum anderen die Gase Kohlendioxid, Wasserstoff und Methan [38, 76, 116]. Neben der resistenten Stärke können auch körpereigene Substanzen wie abgeschilferte Epithelzellen, Muzine, intestinale Enzyme und andere Exkrete als Quellen für KKFS dienen [194], ebenso wie die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide, hier jedoch insbesondere die KKFS-enhaltenden Lipide wie z. B. Tributyrin oder Glyceryltributyrat [129]. Die durch Spaltung dieser Substrate entstehenden KKFS sind relativ schwache organische Säuren ($pK_a \sim 4,8$) und stellen mit ca. 80 % den größten Anteil der luminalen Anionen des Dickdarms dar [203]. Abhängig von der jeweiligen Nahrungszusammensetzung finden sich im Zäkum und Colon ascendens, den Hauptorten der bakteriellen Fermentation [26], KKFS-Gesamtkonzentrationen von ca. 70 - 140 mM, welche entsprechend der Abnahme an degradierbaren Substraten auf ca. 20 - 70 mM im distalen Kolon abfallen. Analog hierzu ist der intraluminale pH-Wert des Zäkums am niedrigsten (insbesondere nach ballaststoffreichen Mahlzeiten), der des Sigmas am höchsten [40, 203].

Die Hauptvertreter der KKFS im menschlichen Dickdarm sind Acetat (C_2), Propionat (C_3) und Butyrat (C_4), die in einem Verhältnis von ca. 60:25:15 % [40, 177] gebildet werden und 90 - 95 % der KKFS-Gesamtmenge ausmachen [114, 154]. Valerat (C_5), Hexanoat (C_6) sowie die verzweigt-kettigen Fettsäuren Isobutyrat (iC_4) und Isovalerat (iC_5) findet man ebenfalls im Dickdarm, jedoch nur in sehr geringen Anteilen [121]. Nach ihrer Entstehung werden ca. 90 % der KKFS über sehr effizient verlaufende, dosisabhängige Transportmechanismen im gesamten Kolon absorbiert [164, 214], kontrovers diskutiert werden allerdings noch die zugrundeliegenden Me-

chanismen. Da nahezu 99 % der KKFS bei einem physiologischen intraluminalen Dickdarm-pH von ca. 6 – 7,5 in ionisierter und damit schwer permeabler Form vorliegen, scheidet eine einfache Diffusion durch die Zellmembran der Kolonozyten weitgehend aus [115, 154]. Als mögliche Wege der Aufnahme wurden daher zum einen die an einen Na^+/H^+ -Antiporter gekoppelte passive Diffusion von protonierten KKFS [19], zum anderen ein Anionenaustausch von KKFS und Bikarbonat vorgeschlagen [178, 182]. Beiden Wegen gemeinsam ist die dosisabhängige Stimulation der Natrium- und Wasser-Absorption [154, 164]. Nach ihrer Aufnahme werden die KKFS entweder lokal von den Kolonepithelzellen als Energielieferanten verwendet oder aber zu unterschiedlichen Anteilen über den Pfortaderkreislauf der Leber zugeführt [38, 40, 214]. Im großen Kreislauf ist im allgemeinen nur Acetat nachweisbar (ca. 30 % der Ausgangskonzentration), Propionat und Butyrat werden in Leber bzw. Darm nahezu vollständig metabolisiert [40, 121].

Trotz der vergleichsweise niedrigen Konzentration von ca. 20 - 22 mmol und des relativ geringen Anteils von nur ca. 15 % [40] an der KKFS-Gesamtmenge ist Butyrat der dominierende Energieträger der Kolonepithelien, auch wenn z. B. andere Energiequellen wie Acetoacetat, Glutamin oder Glukose vorhanden sind [145, 147]. Gegenüber Propionat (30 %) und Acetat (50 %) wird Butyrat ebenfalls bevorzugt metabolisiert (zu 90 %) [177]. Insgesamt werden so nahezu 70 % des Sauerstoffbedarfs der Kolonepithelzellen durch die Verstoffwechslung von Butyrat via β -Oxidation abgedeckt [146, 177], wobei die Abhängigkeit der Kolonozyten von dieser Energiequelle kontinuierlich vom Zäkum zum Rektum ansteigt [189].

Über diese Bereitstellung von Energie hinaus beeinflusst Butyrat weitere zelluläre Parameter wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose [208], wobei die Effekte auf normale und neoplastische Kolonozyten unterschied-

lich sind. So stimuliert Butyrat an normaler Mukosa die physiologische Zellproliferation in den basalen 60 % der Kolonkrypten *in vitro* [66] und *in vivo* [94], nicht jedoch in den apikalen Anteilen. Eine Verschiebung der Proliferationszone in diese oberflächennahen 40 % der Kolonkrypte wird als Biomarker für Präneoplasien angesehen [167]. Der Mechanismus, über den Butyrat die normale mukosale Proliferation steigert, ist nicht genau bekannt, zusätzlich können aber auch bei der streng topischen Anwendung indirekte systemische Effekte beobachtet werden. So zeigt sich nicht nur an der Kolonschleimhaut eine gesteigerte Proliferation, sondern auch an den nichtexponierten Arealen des Dick- und Dünndarms [59, 94]. Im Gegensatz hierzu führen sowohl ein Mangel an Butyrat als auch ein Defekt im Butyratmetabolismus relativ rasch zu einer Atrophie der Kolonmukosa, welche jedoch durch die intraluminalen Gabe von Butyrat voll reversibel ist [94, 208]. Während Butyrat die Proliferation normaler Kolonozyten steigert, wird diese in Adenom- und Karzinomzellen sowohl *in vitro* [221] als auch *in vivo* [166] deutlich gehemmt. Dieser Effekt geht einher mit einer Förderung der Differenzierung dieser Zellen *in vitro* [221] und *in vivo* [132], zu erkennen an einer zunehmenden Bildung von alkalischer Phosphatase [69] und karzinoembryonalen Antigenen [158]. Gemeinsam mit der vermehrten Expression dieser Marker wird eine morphologische Differenzierungssteigerung beobachtet, ebenso eine Veränderung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen an der Oberfläche von Karzinomzellen, die dadurch ihr Vermögen zu invasivem Wachstum teilweise verlieren [13, 208]. Eine signifikante Beeinflussung von Differenzierungsmarkern wie z. B. Bürstensaumenzymen durch eine Inkubation von normalen Kolonozyten mit Butyrat läßt sich weder *in vivo* noch *in vitro* nachweisen [66]. Die Zellmasse der Kolonkrypten wird durch sensibel regulierte Prozesse konstant gehalten. Diese beinhalten zum einen die bereits erwähnten physiologischen Prolife-

rationsvorgänge an der Basis, zum anderen den programmierten Zelltod (Apoptose) an der Oberfläche der Krypten. In diesem Zusammenhang scheint eine gestörte Balance zwischen Zellzuwachs und Zellverlust bei der Entstehung von Neoplasien eine bedeutende Rolle zu spielen [166]. Dementsprechend kann eine präneoplastische Vermehrung von Epithelzellen die Folge einer vermehrten Proliferation oder aber verminderten Apoptose sein [143]. Butyrat induziert darüber hinaus in physiologischen Konzentrationen die Apoptose in kolorektalen Adenom- und Karzinomzelllinien *in vitro* und *in vivo* [70]. Die Mechanismen hinter den paradoxen Effekten von Butyrat auf normale und neoplastische Kolonozyten sind bislang noch nicht vollends verstanden. Diskutiert werden eine Hyperacetylierung von Histonproteinen durch eine Inhibition der Histon-Deacetylase sowie eine Beeinflussung der Phosphorylierung von Histon- und Nichthistonproteinen [78, 121, 208]. Darüber hinaus hemmt Butyrat die DNA-Synthese und reguliert die Gen-Expression diverser Protooncogene wie *c-ras*, *N-ras*, *c-src*, *c-myc*, *c-fos* oder *c-jun* [208]. Zusätzlich zeigen normale und neoplastische Kolonozyten unterschiedliche metabolische Profile. So erfolgt der Stoffwechsel in neoplastischen Zellen *in vivo* nicht mehr auf aerobem Wege sondern anaerob, was zu einer inkompletten Butyrat-Oxidation führt [220].

Neben Effekten auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose zeigen KKFS, insbesondere jedoch Butyrat, auch antiinflammatorische Eigenschaften. Die in diesem Zusammenhang ebenfalls mögliche Rolle in der Pathogenese verschiedener entzündlicher Darmerkrankungen findet Ausdruck in zahlreichen klinischen und experimentellen Ansätzen. So wurden, beruhend auf der Annahme eines (zumindest partiellen) Defektes des mukosalen KKFS-Metabolismus, mehrere unkontrollierte [22, 137, 191, 209] und kontrollierte Studien [23, 165, 168, 184, 192, 210] zur klinischen Anwendung von KKFS durchgeführt. Die Ergebnisse der Studien weisen KKFS,

speziell auch Butyrat, als interessante Substanzen zur effektiven Minderung der Symptome und Entzündungsaktivität bei der CU aus. Darüber hinaus wurden mehrere potentielle Mechanismen präsentiert, wie KKFS diese Verbesserung herbeiführen könnten [41, 94, 98, 120], der exakte Weg ist jedoch bislang unklar. Neben mehreren eher „spekulativen“ Ansätzen [19, 41, 94, 120, 145, 214] konnten Inan et al. für die Inkubation von Kolonkarzinomzellen mit Butyrat eine effektive Hemmung der konstitutiven sowie TNF α -vermittelten NF- κ B-Translokation nachweisen [81].

1.4 Ziele der vorliegenden Untersuchung (Fragestellung)

1. Hemmt die kurzkettige Fettsäure Butyrat die durch TNF α bzw. IL-1 β induzierte nukleäre Translokation von NF- κ B in HeLa 229-Zellen? Zeigt diese Inhibition eine gewisse Zeit- oder Dosisabhängigkeit?
2. Lassen sich die Daten bezüglich der NF- κ B-Translokation aus den Versuchen mit HeLa 229-Zellen auf die kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480 und SW620 übertragen?
3. Wird die Hemmung der NF- κ B-Translokation durch Butyrat über eine Beeinflussung des inhibitorischen I κ B α -Proteins sowie seiner Phosphorylierung vermittelt?
4. Läßt sich durch die lokale Administration von Butyrat bei aktiver distaler Colitis ulcerosa eine Hemmung der NF- κ B-Translokation in

Lamina propria-Makrophagen erzielen? Zeigt sich eine Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung?

5. Korrelieren die immunhistochemisch gewonnenen Daten zur Butyrat-abhängigen Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in Lamina propria-Makrophagen mit den Erkenntnissen aus Disease Activity Index (DAI), Endoskopie-Score und Histologie-Score?

2 Material und Methoden

Zur Charakterisierung des bislang noch nicht genauer bekannten Wirkmechanismus der KKFS Butyrat wurden Elemente der NF- κ B-Signaltransduktionskaskade untersucht: NF- κ B (p65), I κ B α und Phospho-I κ B α . Als Modelle hierfür dienten mehrere Adenokarzinomzelllinien, die mit Butyrat inkubiert und anschließend mit TNF α oder IL-1 β stimuliert wurden. Der Nachweis von NF- κ B erfolgte mittels einer spezifischen Immunfluoreszenzmarkierung. Die Wirkung von Butyrat auf das inhibitorische I κ B α -Protein sowie dessen Phosphorylierung (Phospho-I κ B α) wurde in einem Western Blot-System untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine Prüfung der möglichen klinischen Anwendung an Biopsien mit Butyrat behandelte CU-Patienten: in einer immunenzymatischen Doppelfärbung konnten NF- κ B und CD68, ein Makrophagenmarker, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden anschließend mit klinischen und endoskopischen Daten korreliert und statistisch ausgewertet. Für morphologische bzw. histopathologische Fragestellungen erfolgten Färbungen mit Hämalaun oder Hämalaun-Eosin.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Als *in vitro*-Modelle kamen in den Versuchen die nachfolgend aufgeführten Adenokarzinomzelllinien zum Einsatz:

HeLa 229: Bei dieser Zellart handelt es sich um eine bereits 1951 isolierte humane Zervixkarzinomzelllinie, die aus dem Primärtumor einer 31jährigen schwarzen Patientin gewonnen werden konnte. Morphologisch imponieren die Zellen epithelähnlich und zeichnen sich durch einschichtiges adhärentes Wachstum aus. Die Teilungszeit beträgt ca. 48 Stunden. HeLa 229 war die erste Zelllinie, die kontinuierlich kultiviert werden konnte und hat sich als stabile sowie relativ universelle Laborzelle bewährt.

SW480 (SW-480): Diese Zellen epithelialen Ursprungs wurden aus einem entdifferenzierten kolorektalen Adenokarzinom eines 50jährigen weißen Mannes isoliert. Die SW480-Zellen sind durch einschichtiges und adhären-tes Wachstum gekennzeichnet. Ihre Zellteilungszeit ist mit 25 – 30 Stunden spezifiziert.

SW620 (SW-620): Diese Zellen stammen aus dem gleichen Patienten wie SW480. Sie wurden jedoch nicht aus dem Primärtumor, sondern im Rahmen einer offenen chirurgischen Biopsie aus einer Lymphknotenmetastase isoliert.

HeLa 229-Zellen (ACC 57) und SW480-Zellen (ACC 313) wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. SW620-Zellen (CCL-227) entstammen der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA).

2.1.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus-Brutschrank B5060, Heraeus, Hanau) in den für sie jeweils spezifischen Medien (Anhang 7.1)

kultiviert. Für ein optimales Wachstum waren eine Temperatur von 37 °C und die Anwesenheit von 5 % CO₂ erforderlich. Je nach Versuchsbedingungen und benötigter Gesamtzellzahl erfolgte das Wachstum in 25 cm²- oder 75 cm²-Kulturflaschen (Costar, Cambridge MA, USA). Ein Wechsel des Kulturmediums wurde bei allen Zelllinien in regelmäßigen Abständen von 72 Stunden durchgeführt (4 ml je 25 cm²-Flasche bzw. 20 ml pro 75 cm²-Flasche). Beim Erreichen einer 75 %igen Konfluenz erfolgte entweder die Vorbereitung der Zellen für die Versuche oder eine Subkultivierung. Im letzteren Fall wurden 10 % der Ausgangszellmenge in eine neue Kulturflasche überführt und mit dem entsprechenden Zellkulturmedium auf 4 ml (25 cm²-Flasche) bzw. 20 ml (75 cm²-Flasche) aufgefüllt. Für die Versuche kamen jeweils Passagen zwischen 5 und 29 zur Anwendung.

Alle Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten an einer Hood (Gelaire BSB 4, Bio-Flow Technik, Meckenheim) unter sterilen Bedingungen.

2.1.3 Allgemeine Vorbereitung der Zellen

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf 25 cm²-Kulturflaschen, die Werte in Klammern auf 75 cm²-Flaschen.

Von den in Kultur befindlichen Zellen wurde zunächst der Medienüberstand abgesaugt. Die verbliebenen adhärennten Zellen wurden mit 3 ml (5 ml) sterilem PBS (Phosphate Buffered Saline Dulbecco's, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gewaschen und kurz mit 2 ml (4 ml) Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA • 4 Na, Life Technologies GmbH) gespült. Nach erneuter Zugabe von 1 ml (3 ml) Trypsin/EDTA und fünfminütiger Inkubation bei 37 °C (mit Ausnahme der SW620-Zellen:

4 Minuten bei Raumtemperatur) erfolgte die Lösung der Zellen aus der Kulturflasche durch leichtes Beklopfen oder unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (Disposable Cell Scraper, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen). Die enzymatische Trypsinierungsreaktion wurde durch Zugabe von 4,5 ml (7,5 ml) Medium gestoppt. 0,5 ml der Zellsuspension wurden für die Zellzählung mittels einer Neubauer-Zählkammer (Schott-Glas, Mainz) entnommen, die verbliebenen 5 ml (10 ml) in einem 15 ml- (50 ml-) Zentrifugenröhrchen (Greiner Labortechnik GmbH) für 10 Minuten bei 4 °C und 900 U/min zentrifugiert (Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, Osterode). Nach Entfernung des Medienüberstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit der vorher berechneten Menge frischen Mediums auf die gewünschte Zellzahl pro Milliliter.

2.1.4 Zellstimulationsversuche zur Wirkung von Butyrat auf die nukleäre Translokation von NF- κ B (p65)

Die nähere Untersuchung des Einflusses von Butyrat auf die Translokation der p65-Untereinheit des NF- κ B-Dimers erfolgte mittels einer spezifischen Immunfluoreszenzmarkierung. Hierfür wurden jeweils $1 - 2 \times 10^4$ Zellen in 1-Kammer-Chamber-Slides aus Glas (Lab-Tek II Chamber Slide w/cover RS Glass Slide Sterile 1 Well, Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden) ausgesät. Die Zellzahl war dabei von der jeweiligen Zelllinie abhängig (HeLa 229 1×10^4 , SW480 und SW620 2×10^4 Zellen). Nach 48stündigem Wachstum wurde das Kulturmedium gewechselt und Butyrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in unterschiedlichen Konzentrationen (2 mM, 4 mM und 6 mM) für 12, 24, 36 und 48 Stunden hinzugegeben. Eine Stunde vor

Beendigung der Inkubationsphase erfolgte die 60minütige Stimulation der Präparate mit 1000 U/ml (50 ng/ml) TNF α (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) oder 20 ng/ml IL-1 β (R&D Systems GmbH, Wiesbaden).

2.1.5 Zellstimulationsversuche zur Beeinflussung der I κ B α -Phosphorylierung durch Butyrat

Zur näheren Charakterisierung der Wirkung von Butyrat auf das inhibitorische I κ B α -Protein sowie dessen Phosphorylierung wurde ein Western Blot-System verwendet. Hierfür erfolgte zunächst die Aussaat von jeweils 2,5 - 7,5 x 10⁵ Zellen (HeLa 229, SW480, SW620) in 25 cm²-Kulturflaschen. Kurz vor dem Erreichen einer 75 %igen Konfluenz wurden die Zellen durch einen sechsständigen Serumentzug (serumfreies Medium) synchronisiert. Es schloß sich eine Wachstumsphase von mindestens 12 Stunden in serumhaltigem Medium an. Danach wurde Butyrat in unterschiedlichen Konzentrationen (2 und 4 mM) für 24 oder 48 Stunden hinzugegeben. Nach Beendigung der Präinkubationsphase erfolgte die Stimulation der Zellen mit 2000 U/ml TNF α (entsprechen 100 ng/ml) oder 20 ng/ml IL-1 β für 2, 10 oder 30 Minuten. Im Anschluß an die Stimulationsphase wurden das Medium abgesaugt, die adhärennten Zellen mit 3 ml sterilem PBS gewaschen und kurz mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA • 4 Na) gespült. Nach erneuter Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA und fünfminütiger Inkubation bei 37 °C (Ausnahme: SW620, 4 Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Zellen durch Beklopfen oder unter Zuhilfenahme eines Zellschabers aus der Kulturflasche gelöst. Die enzymatische Trypsinierungsreaktion wurde durch Zugabe von 4,5 ml Medium gestoppt.

0,5 ml der Zellsuspension wurden für die Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer entnommen, die verbleibenden 5 ml in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei 4 °C und 900 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des Medienüberstandes wurden die Zellen mit 5 ml sterilem PBS gewaschen und nochmals für 10 Minuten bei 4 °C und 900 U/min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert und in ein silikonisiertes Mikrozentrifugenröhrchen (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, Utah, USA) überführt. Danach erfolgte erneut eine Zentrifugation, diesmal für 2 Minuten bei 4 °C und 12000 U/min (Biofuge fresco, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2 Biopsien von Colitis ulcerosa-Patienten

Die verwendeten Biopsien entstammen einer unter Doppelblindbedingungen durchgeführten multizentrischen klinischen Studie, in der die Behandlung der distalen CU mit KKFS untersucht wurde [165]. Darüber hinaus konnten Erkenntnisse über die Wirkung von KKFS auf die mukosale Hyperproliferation gewonnen werden [169].

Von den 47 Patienten mit der gesicherten Diagnose einer aktiven distalen CU, die ursprünglich an der Studie teilgenommen hatten, wurden die Biopsien von 11 Patienten (weiblich n = 5, männlich n = 6, medianes Alter 39 Jahre, Varianzbreite 19 - 59) neuerlich untersucht. Es sollte dabei der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Ausmaß die kurzketige

Fettsäure Butyrat eine Wirkung auf die nukleäre Translokation von NF- κ B in Lamina propria-Makrophagen zeigt. Sechs der 11 Patienten entstammten der Butyrat-Gruppe und fünf der Placebo-Gruppe. Zusätzlich zu den Biopsien wurden die bei Studiendurchführung erhobenen klinischen und endoskopischen Parameter dieser 11 Patienten vor dem Hintergrund der Fragestellung erneut betrachtet.

2.2.1 Studienaufbau

Die 11 Patienten wurden randomisiert der Therapie mit 100 mmol/l Butyrat (n = 6) oder Placebo (n = 5) in Form von isoosmolarer Natriumchlorid-Lösung zugeordnet. Die topische Anwendung der Substanzen erfolgte zweimal täglich über einen Zeitraum von insgesamt 8 Wochen durch die Patienten selbst. Als Darreichungsform wurden Klysmen gewählt, die jeweils 60 ml der entsprechenden Lösungen enthielten und deren pH-Wert auf 5,5 eingestellt war (hergestellt durch: Dr. Falk Pharma, Freiburg im Breisgau). Die Einwirkzeit nach der Irrigation betrug ca. 30 Minuten; die Patienten waren aufgefordert, währenddessen eine entsprechende links-laterale Ruheposition einzunehmen. Eine bereits vorbestehende orale anti-inflammatorische Medikation mit Salazosulfapyridin (Sulfasalazin), 5-Aminosalicylsäure (Mesalazin) oder Kortikosteroiden wurde beibehalten. Bei einer bereits durchgeführten rektalen Lokalthherapie, wie zum Beispiel die Verabreichungen von Kortikosteroid- oder Mesalazin-Klysmen, erfolgte deren Abbruch vor Studienbeginn.

Für den Verlauf der Untersuchung wurden die folgenden Ausschlusskriterien definiert: Vorliegen sonstiger schwerer Erkrankungen, Schwangerschaft, Alter < 18 Jahre, Non-Compliance sowie eine Ausdehnung der CU nach

proximal über linke Kolonflexur hinaus. Auch beim Auftreten einer Remission, gemessen mit dem Wert des Disease Activity Index (DAI, siehe 2.2.5), erfolgte der Ausschluß aus der Studie.

2.2.2 Entnahme der Biopsien

Zur Darstellung des Krankheitsverlaufes wurden zu insgesamt drei Zeitpunkten am Übergang des Colon sigmoideum in das Rektum Biopsien ($n = 3$) entnommen. Dies erfolgte im Rahmen einer kompletten Koloskopie vor Beginn der Therapie sowie einer Rektosigmoidoskopie jeweils 4 und 8 Wochen nach Therapiebeginn. Die Biopsien wurden hierbei jeweils unter Anwendung eines Olympus CF-10 L Koloskops (Olympus Optical, Hamburg) gewonnen. Im Rahmen der Vorbereitung für die Koloskopie wurden den Patienten zur orthograden Reinigung des Darmes zwei bis drei Liter einer Golytely-Lösung (Anhang 7.2.1) über einen Zeitraum von drei bis vier Stunden oral verabreicht. Die Vorbereitung für die Rektosigmoidoskopie erfolgte mit zwei Practo clyss-Einläufen (Anhang 7.2.2) kurz vor Untersuchungsbeginn. Um möglichen Blutungskomplikationen vorzubeugen, wurde vor jeder Untersuchung die Thrombozytenzahl, der Quick-Wert und die partielle Thromboplastinzeit (PTT) der Patienten bestimmt.

2.2.3 Aufarbeitung der Biopsien

Die entnommenen Biopsien wurden umgehend in 20 ml Transportmedium (Anhang 7.2.3) überführt und für die weitere Verarbeitung in Gewebe-

Einbettkassetten (UNI-Safe, Medim Histotechnology, Gießen) verbracht. Nach der Fixation für 24 Stunden in 96 %igem Ethanol (Aqua bidest., 100 % Ethanol, J. T. Baker B. V., Deventer, Holland), folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Anhang 7.2.4). Die Biopsien wurden anschließend in flüssigem Paraffin (Paraplast, Gewebereinbettmaterial, Schmelzpunkt 56 °C, Sherwood Medical Co., St. Louis, USA) eingelegt und während der folgenden 15 Stunden zur vollständigen Durchdringung des Gewebes bei 60 °C in einem Wärmeschrank aufbewahrt. Danach erfolgte die eigentliche Einbettung in flüssigem Paraffin (60 °C) unter Zuhilfenahme eines Einbettapparates (Tissue Block System, TBS 88, Dispenser Unit, Medite Medizintechnik, Burgdorf). Von den durch Trocknung bei Raumtemperatur entstandenen Paraffinblöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom (Modell Jung SM 2000 R, Leica, Nussloch) Schnitte von 2 µm Dicke angefertigt und auf mit Gelatine beschichtete Glasobjektträger (76 x 26 mm, Stärke 1 mm, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) überführt. Die so entstandenen Präparate wurden anschließend mit einer Eiweiß-Glycerin-Lösung (sog. „Streckwasser“, Anhang 7.2.5) auf einer Heizplatte (Typ 12800, Medax, Kiel) bei 40 °C gestreckt und für mindestens 24 Stunden in einen Trockenschrank (Typ U 25, Memmert, Schwabach) verbracht (37 °C). Danach erfolgte bis zur weiteren Verwendung die Aufbewahrung in Präparatekästen.

2.2.4 Histologische Parameter

Die Biopsien wurden für die histopathologischen Untersuchungen in 10 %igem Paraformaldehyd (Anhang 7.2.6) fixiert und entsprechend aufge-

arbeitet. Nach der Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe (Anhang 7.2.4) erfolgte die Färbung mit Hämalaun-Eosin (Material und Methoden, 2.5.1). Anschließend wurden die Biopsien bei unterschiedlichen Vergrößerungen (50 - 250 x) lichtmikroskopisch (Laborlux S, Leitz, Wetzlar) auf folgende Parameter hin untersucht:

1. Gesamtveränderungen: Ulzerationen, Kryptenabszesse, Kryptenarchitektur
2. Lamina propria: Neutrophile, Lymphozyten und Plasmazellen, Lymphfollikel
3. Oberflächen- und Kryptenepithel: Epithelhöhe, Basophilendichte, Größe der Schleimvakuolen, Neutrophilendichte

Die Beurteilung der Biopsien erfolgte vor Beginn der Therapie sowie nach 4 und 8 Wochen. Entsprechend der Erkrankungsintensität wurden Grad 0 für normale Befunde vergeben, Grad 1 für leichte, Grad 2 für moderate und Grad 3 für schwere Veränderungen.

2.2.5 Klinischer Verlauf

Die Reaktion der Patienten auf die Butyrat-Behandlung wurde vor Beginn der Therapie sowie nach 4 und 8 Wochen mit dem Disease Activity Index (DAI) nach Sutherland et al. ermittelt [198]. Dieser Index faßt die folgenden vier Variablen zusammen: Stuhlfrequenz, rektale Blutung, sigmoidoskopische Erscheinung der Mukosa und ärztliche Einschätzung des Erkrankungsgrades. Jeder Parameter hat jeweils eine Schwankungsbreite von 0 - 3 Punkten, wobei 0 Punkte den Normalzustand und 3 Punkte die schwerste Ausprägung repräsentieren. Der Gesamt-DAI kann also Werte zwischen 0

und 12 Punkten annehmen. Eine teilweise Besserung der Erkrankungssituation wurde bei einer Verminderung des DAI um 3 oder mehr Punkte (der DAI mußte jedoch noch > 3 sein), eine komplette Besserung bei einem DAI von kleiner 3 Punkten am Ende der Studie angenommen.

2.2.6 Endoskopische Parameter

Das makroskopische Erscheinungsbild der Mukosa wurde vor Beginn der Therapie sowie nach 4 und 8 Wochen mittels des endoskopischen Scores nach Harig et al. beurteilt [71]. Dieser berücksichtigt die folgenden fünf Kriterien: Rötung, Ödem, Oberflächenbeschaffenheit, Brüchigkeit sowie Erosionen. Jeder dieser Parameter ist durch eine Schwankungsbreite von 0 - 2 Punkten gekennzeichnet, wobei 0 Punkte das Nichtvorhandensein, 1 Punkt eine milde und 2 Punkte eine schwere Ausprägung darstellen. Die Gesamtpunktzahl dieses Scores kann Werte zwischen 0 und 10 Punkten annehmen.

2.3 *Immunfluoreszenz/Immunhistochemie*

2.3.1 Immunfluoreszenzmarkierung von NF- κ B (p65) an Zelllinien

Zunächst wurden die Mediumkammern der Chamber Slides mittels eines speziellen Separators entfernt und die Präparate kurz in Phosphate Buffered Saline 0,01 M, pH 7,4 (PBS, Anhang 7.3.1) gespült. Anschließend erfolgte

die Fixation der Zellen mit Methanol/Glycin (Anhang 7.3.2) für 5 Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder mit frisch zubereitetem Paraformaldehyd 4 % (Anhang 7.2.6) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden danach erneut in PBS gewaschen (3 x 1 Minute) und für 4 Minuten mit 0,1 %igem PBS/Triton[®]X-100 (Anhang 7.3.3) bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach drei erneuten Spülungen in PBS (jeweils 1 Minute) erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit PBS/BSA 0,2 % (BSA, Bovine Specific Albumin, Anhang 7.3.4). Schließlich wurden je $500\ \mu\text{l}$ eines gegen die p65-Untereinheit von NF- κB gerichteten Primärantikörpers (Anhang 7.3.5) auf die Objektträger pipettiert (Multipette, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg). Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen (3 x 1 Minute) und $500\ \mu\text{l}$ eines Cy3[™]-gekoppelten Sekundärantikörpers (Anhang 7.3.5) aufgetragen. Die Verarbeitung des Sekundärantikörpers erfolgte unter weitgehender Vermeidung von Lichteinstrahlung, die 60minütige Inkubationsphase bei Raumtemperatur in einer feuchten und lichtundurchlässigen Kammer (Noras Röntgen- und Medizintechnik GmbH, Würzburg). So konnte ein vorzeitiges Ausbleichen der Präparate weitestgehend vermieden werden. Es schlossen sich erneute Waschschrte in PBS (3 x 1 Minute) sowie eine kurze Spülung in Aqua bidest. an. Abschließend wurden die noch etwas feuchten Objektträger mit bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ verflüssigter Glyceringelatine (Kaiser's Glyceringelatine, Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckt (Deckgläser, 24 x 50 mm, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) und in Präparatekästen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert. Die Bewertung der Präparate erfolgte frühestens nach einem Zeitraum von 24 Stunden, um eine ausreichende Aushärtung der Glyceringelatine zu gewährleisten. Darüber hinaus ließ sich durch die vollständige Trocknung eine höhere Schärfe sowie bessere Beurteilbarkeit der Zellen

erzielen. Für die statistische Auswertung wurden pro untersuchtem Zeitpunkt (12, 24, 36 und 48 h) jeweils 5 x 100 Zellen bei 60facher Vergrößerung mittels eines Mikroskops mit Epifluoreszenzoptik (Zeiss Axioskop, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen) unter Verwendung eines speziellen Filters für den Cy3™-Komplex ausgezählt. Jeder Versuch wurde zudem mindestens dreimal durchgeführt.

2.3.2 Immunfluoreszenzmarkierung von NF- κ B in Lamina propria-Makrophagen

Die Präparate wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (Anhang 7.2.4) entparaffiniert, kurz in PBS gespült und danach mittels 0,1 %igem PBS/Triton®X-100 für 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach drei Spülungen in PBS (jeweils 1 Minute) wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit PBS/BSA 0,2 % blockiert (3 x 1 Minute). Für die Markierung des zu untersuchenden Antigens wurden jeweils 100 μ l des spezifischen Primärantikörpers gegen NF- κ B (p65) auf die Objektträger pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (3 x 1 Minute) und 100 μ l eines entsprechenden Cy3™-gekoppelten Sekundärantikörpers aufgetragen. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer sowie unter Lichtabschluß. Nach drei Waschschritten mit PBS (3 x 1 Minute) wurden die Präparate kurz in Aqua bidest. gespült, die noch feuchten Objektträger mit bei 60 °C verflüssigter Glyceringelatine eingedeckt und bei 4 °C im Kühlschrank in Präparatekästen gelagert. Frühestens nach

einem Zeitraum von 24 Stunden erfolgte die Betrachtung der Präparate, um eine ausreichende Trocknung und Aushärtung der Glyceringelatine zu gewährleisten. Die Auswertung der Färbungen ist unter verschiedenen Vergrößerungen an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop) mittels eines spezifischen Filters für den Cy3TM-Komplex vorgenommen worden.

2.3.3 Immunenzymatische Doppelfärbung von NF- κ B (p65) und Lamina propria-Makrophagen (CD68) in Biopsien

Zunächst wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und kurz mit Tris Buffered Saline 0,05 M Tris/HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6 (TBS, Anhang 7.3.6) gespült. Anschließend erfolgte eine 10minütige Blockade der endogenen Peroxidase- bzw. Pseudoperoxidaseaktivität (Peroxidase Blocking Reagent, Dako Diagnostika GmbH, Hamburg). Nach erneuter Spülung mit TBS (1 x 1 Minute) wurde ein Gemisch aus den beiden Primärantikörpern (jeweils 100 μ l pro Objektträger) gegen NF- κ B (p65) und CD68 aufgetragen (Anhang 7.3.5) und für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Um Reaktionen mit unspezifischen Bindungsstellen zu vermeiden, waren die Antikörper in TBS/BSA 1 % (Anhang 7.3.7) diluiert. Es folgten drei Waschschrte (jeweils 1 Minute) in TBS, bevor die Sekundärantikörper aufgetragen werden konnten. Hier kam zum einen ein Peroxidase-konjugiertes und Antikörper-gebundenes Dextran-Polymer (Dako EnVision+TM-System, Dako Diagnostika GmbH), zum anderen ein Alkalische Phosphatase-konjugierter Antikörper zum Einsatz (Anhang 7.3.5). Die Sekundärantikörper wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer

inkubiert und die Präparate anschließend mit TBS gewaschen (3 x 1 Minute). Zunächst folgte nun der Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in blau (Anhang 7.3.8): durch eine Spritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit 0,2 μm -Filteraufsatz (FP 030/3, Schleicher & Schuell, Dassel) wurde die frisch zubereitete Farblösung auf die Präparate getropft. Die Reaktion dauerte im Durchschnitt 4 - 6 Minuten bis deutliche blaue Präzipitate zu erkennen waren. Anschließend wurde die Peroxidase-Aktivität mittels des AEC Substrat Chromogen Systems (Dako Diagnostika GmbH) in rot dargestellt, die Detektionszeit betrug zwischen 12 und 25 Minuten. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, abschließend die Objektträger kurz in Aqua bidest. gespült, in noch feuchtem Zustand mit bei 60 °C verflüssigter Glyceringelatine eingedeckt und bei 4 °C in Präparatekästen aufbewahrt. Die Betrachtung der Präparate erfolgte frühestens nach 24 Stunden, um eine ausreichende Trocknung und Aushärtung der Glyceringelatine zu gewährleisten. Für die statistische Auswertung wurden zu jedem Betrachtungszeitpunkt jeweils 100 Makrophagen bei 250facher Vergrößerung mittels eines Lichtmikroskops (Leitz Laborlux S) ausgezählt. Jeder Versuch wurde zudem mindestens dreimal durchgeführt.

2.4 Western Blot

2.4.1 Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die vorbereiteten Zellpellets (Material und Methoden 2.1.5) wurden zunächst durch Zugabe von 200 μl kaltem (4 °C) Lysis-Puffer (Anhang 7.4.1)

und mittels eines Schüttlers (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) gelöst. Es schloß sich eine 10sekündige Behandlung mit Ultraschall (Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin) an, nach der die Proben wiederum gut vermischt (Vortex) und bei 7500 U/min sowie 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert wurden (Biofuge fresco, Heraeus Instruments). Vom Überstand wurden 201 μl entnommen und in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte aus 1 μl des Überstandes die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei 750 nm mittels eines BioRad DC Protein Assays (BioRad, Hercules CA, USA; Tecan-Spectra-Spektroskop, Tecan, Crailsheim). Als Referenz dienten dabei verschiedene Rinderalbuminkonzentrationen: Stammlösung mit 5 mg/ml Albumin (BSA Fraction V, Boehringer); Herstellung einer Verdünnungsreihe (1 : 2). Die Zelllysate wurden in 70 μl Sample Puffer (Anhang 7.4.2) mit 20 %igem 2-Mercapto-Ethanol-Zusatz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) durch Vortexbehandlung gemischt, 3 Minuten lang auf 95 °C erhitzt und danach 5 Minuten auf Eis gekühlt. Jeweils 50 μg der Proteinproben konnten dann mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (Protean II Cell, BioRad) aufgetrennt werden. Die Polyacrylamidkonzentration des Running-Gels betrug, abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins, 10 – 15 % (Anhang 7.4.3), die des Stacking-Gels 5 % (Anhang 7.4.5). Als Größenmarker wurden in mindestens eine Geltasche 10 μl eines standardisierten Proteingemisches (SDS-PAGE Standards, BioRad) geladen.

2.4.2 Blotting und Färbung

Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurde das Proteingemisch durch Elektroblothing (mit 400 – 650 mA) auf eine

Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran (Immobilion-Membrane, Millipore, Bedford MA, USA) überführt (Trans Blot System, BioRad; EC-Apparatus EC140, EC-Apparatus Co., Holbrook NY, USA). Zur Beurteilung der Proteinbeladung auf Gleichmäßigkeit erfolgte eine Färbung der Membran für 2 - 5 Minuten mit Ponceau S (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), überschüssiger Farbstoff wurde vor der Betrachtung auf einem UV-Tisch (Biometra TI3, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) durch mehrmaliges Waschen in Aqua bidest. entfernt. Durch eine Spülung mit TBS (Anhang 7.4.7)/0,1 % Polyethoxysorbitanlaurat (Tween[®] 20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) konnte die Blottingmembran wieder entfärbt werden. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5 %igem Trockenmilchpuffer (Anhang 7.4.8) über Nacht bei 4 °C blockiert, die Membran anschließend mit TBS/0,1 % Tween[®] 20 (3 x 30 Sekunden, 1 x 10 Minuten) gewaschen. Nun erfolgte die dreistündige Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (Anhang 7.4.9), gefolgt von mehreren Waschschritten mit TBS/0,1 % Tween[®] 20 (zunächst für 3 x 30 Sekunden, dann von 3 x 15 Minuten). Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 %igem Trockenmilchpuffer über 30 Minuten und Spülung mit TBS/0,1 % Tween[®] 20 (2 x 30 Sekunden, 1 x 10 Minuten) wurde die Blottingmembran für eine Stunde mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Anhang 7.4.9) inkubiert. Der Nachweis des Sekundärantikörpers erfolgte nach mehreren Waschvorgängen in TBS/0,1 % Tween[®] 20 (3 x 30 Sekunden, 2 x 15 Minuten) mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK). Hierbei kam es zu einer durch die Meerrettichperoxidase katalysierten Oxidation von Diazylhydrazid mit anschließender Emittierung von Licht, welches durch Belichtung von lichtsensitiven Filmen (Hyperfilm

ECL, Amersham) sichtbar gemacht wurde. Die dabei verwendeten Belichtungszeiten lagen zwischen wenigen Sekunden und mehreren Minuten.

Für mögliche weitere „Färbungen“ der Membranen mit anderen Primärantikörpern wurden diese mit Frischhaltefolie luftdicht verschlossen und aufbewahrt. Bei erneuter Verwendung erfolgte zunächst eine 30minütige Inkubation bei 65 °C in Stripping Puffer (Anhang 7.4.11) zur Ablösung noch gebundener Antikörper. Danach wurden die Blottingmembranen für 2 x 10 Minuten in TBS/0,1 % Tween® 20 gewaschen, gefolgt von einer Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 %igem Trockenmilchpuffer für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend konnten die PVDF-Membranen mit einem anderen Primärantikörper gefärbt werden.

2.5 Histologische/zytologische Färbungen

2.5.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Präparate wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (Anhang 7.2.4) entparaffiniert und kurz in Aqua bidest. gespült. Es folgte die 10 - 15minütige Färbung mit Hämalaun (Mayer's Hämalaun-Lösung, Merck KGaA). Anschließend wurden die Präparate für 10 Minuten gewässert und für ca. 3 Minuten mit Eosin (Merck KGaA) gegengefärbt. Es mußte generell etwas überfärbt werden, da beim anschließenden Spülen (2 x kurz in Aqua bidest.) wieder Farbe verloren ging. Um ein weiteres Auswaschen des Eosins zu vermeiden wurde das Entwässern in deutlich reduziertem Umfang durchgeführt. Es erfolgte lediglich eine kurze Spülung in

100 %igem Alkohol sowie die Überführung in Xylol (5 Minuten). Abschließend wurden die Präparate mit Entellan (Merck KGaA) eingedeckt.

2.5.2 Hämalaun-Färbung

Die Präparate wurden zunächst für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Aceton (J. T. Baker B. V., Deventer, Holland) fixiert und für mindestens 1 Stunde luftgetrocknet. Anschließend erfolgte eine kurze Spülung in Aqua bidest., der sich die progressive Färbung mit Hämalaun anschloß (ca. 1 - 3 Minuten). Das Fortschreiten des Färbeprozesses wurde von Zeit zu Zeit unter dem Mikroskop kontrolliert. Es folgte eine kurze Spülung in Aqua bidest., danach wurden die Präparate in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Nun erfolgte eine Spülung unter fließendem Leitungswasser (ca. 10 Minuten) sowie nochmals kurz in Aqua bidest. Abschließend wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (Anhang 7.2.4) entwässert und mit Entellan eingedeckt.

2.6 *Statistische Auswertung*

Für die statistische Auswertung der Immunfluoreszenzmarkierungen zur nukleären Translokation von NF- κ B wurden pro Zeitpunkt (12, 24, 36 und 48 Stunden) von jedem Präparat 5 Gesichtsfelder à 100 Zellen ausgezählt. Zudem wurde jeder Versuch mindestens dreimal durchgeführt. Aus den gewonnenen Einzelwerten erfolgte die Bildung des arithmetischen Mittel-

wertes, als Streuungsmaß wurde der Standardfehler berechnet. Die Werte im Ergebnisteil sind in der Form „Mittelwert \pm Standardfehler“ angegeben. Mittelwertdifferenzen wurden mit dem Student's T-Test für verbundene Stichproben ermittelt und bei einem p-Wert von kleiner 0,05 als statistisch signifikant angenommen.

Die statistische Analyse der Doppelmarkierung von NF- κ B und CD68, des DAI, des endoskopischen und histologischen Scores erfolgte anhand der erhobenen Daten von Butyrat- und Placebo-Gruppe jeweils vor Therapiebeginn sowie nach 4 und 8 Wochen. In den Biopsien wurden pro Patient zu jedem Zeitpunkt 100 Makrophagen ausgezählt und in Bezug auf ihre Aktivierung (nukleäre Translokation von NF- κ B) beurteilt. Darüber hinaus erfolgten mindestens drei Wiederholungen jedes Versuchs. Aus den ermittelten Werten zur NF- κ B-Translokation sowie den Punktzahlen des DAI, des endoskopischen und histologischen Scores wurde jeweils der arithmetische Mittelwert gebildet und als Streuungsmaß der Standardfehler berechnet. Im Ergebnisteil sind die Werte in der Form „Mittelwert \pm Standardfehler“ angegeben. Mittelwertdifferenzen wurden durch parametrische (ANOVA = Analysis of variance, Student's T-Test für verbundene Stichproben, Tukey-Test) oder parameterfreie Testverfahren (Friedman-Test, Wilcoxon-Test) ermittelt und bei einem p-Wert von kleiner 0,05 als statistisch signifikant und bei $p < 0,001$ als hochsignifikant angenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Statistiksoftware SigmaStat for Windows Version 2.03 (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA) und mit der Tabellenkalkulation Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Immunfluoreszenzfärbungen an Zelllinien

Zur Klärung der Frage, ob und inwieweit die kurzkettige Fettsäure Butyrat die nukleäre Translokation von NF- κ B zu hemmen vermag, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem spezifischen Antikörper gegen die p65-Untereinheit des NF- κ B-Heterodimers durchgeführt. Nach durchschnittlich 48stündigem Wachstum in Chamber-Slides erfolgte eine Vorinkubation der Zelllinien HeLa 229, SW480 und SW620 mit 2 und 4 mM Butyrat über Zeiträume von 12, 24, 36 sowie 48 Stunden. Anschließend wurden die Präparate für 60 Minuten mit 1000 U/ml TNF α oder 20 ng/ml IL-1 β stimuliert. Eine Behandlung der Zellen mit höheren Butyrat-Konzentrationen (6 mM und mehr) führte zu toxischen Effekten, die sich durch ein vermehrtes Auftreten von Zytoplasmaausläufern sowie Zellfragmentationen bemerkbar machten. Die mit 6 mM Butyrat behandelten Zellen wurden von allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

3.1.1 Butyrat inhibiert die TNF α -induzierte Translokation von NF- κ B in HeLa 229-Zellen

Nach der Markierung von NF- κ B mittels des spezifischen Primärantikörpers sowie Anfärbung durch einen Cy3TM-gekoppelten Sekundärantikörper wurde in allen unbehandelten HeLa 229-Zellen (nur Medium) ein deutlich rot fluoreszierendes Zytoplasma sichtbar (*Abb. 3 A*). Die Kerne der Zellen

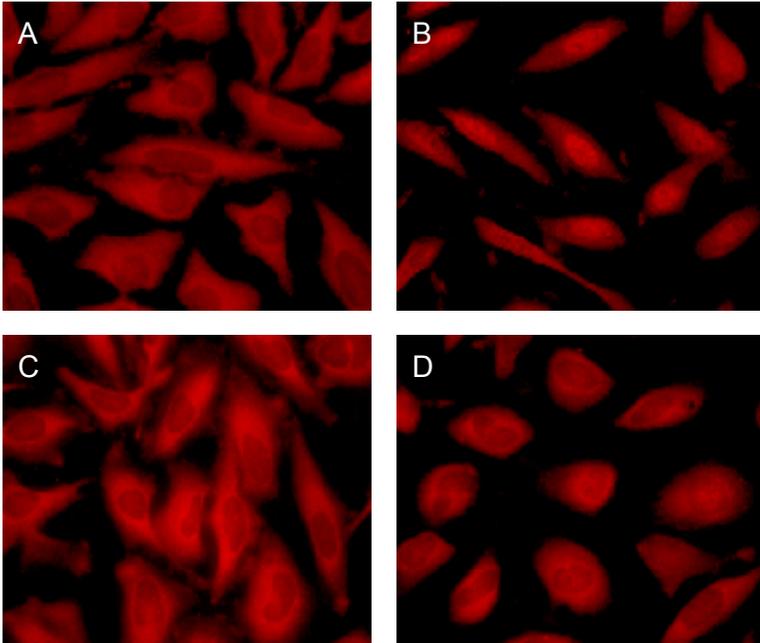


Abb. 3: Butyrat hemmt die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte nukleäre Translokation von $\text{NF-}\kappa\text{B}$. HeLa 229-Zellen blieben unbehandelt (A), wurden mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert (B), vor der $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation mit Butyrat inkubiert (C) oder ausschließlich mit Butyrat behandelt (D). Vergrößerung: 100fach.

waren nicht angefärbt, d. h. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ war nur im Zellplasma vorhanden und nicht nukleär transloziert bzw. die Zellen nicht aktiviert. Ein ähnliches Färbeverhalten zeigte sich bei den ausschließlich mit Butyrat inkubierten Zellen (Abb. 3 D). Auch hier erschienen die Kerne negativ bei gleichzeitig kräftig fluoreszierendem Zytoplasma. Eine Stimulation mit 1000 U/ml $\text{TNF}\alpha$ für 60 Minuten führte in nahezu allen HeLa 229-Zellen zu einer Translokation von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in den Zellkern. Dieser war nun an seiner gegenüber dem Zytoplasma deutlich kräftigeren roten Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 3 B). Eine Vorbehandlung der Zellen für 12 bis 48 Stunden mit 2 bzw.

4 mM Butyrat führte sowohl zu einer zeit- als auch dosisabhängigen Inhibition der $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten nukleären $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Translokation (*Abb. 3 C*). Hier zeigte sich das gleiche Färbeverhalten wie in unbehandelten, nicht stimulierten Zellen mit deutlicher Fluoreszenz im Zytoplasma und negativen Kernen.

Durch die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ konnte bei $87,22 \pm 3,80$ % der HeLa 229-Zellen eine nukleäre Translokation von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ hervorgerufen werden. Eine Vorinkubation mit 2 mM Butyrat (*Abb. 4*) ergab nach 24 Stunden eine leichte Abnahme des Anteils der aktivierten Zellen ($\text{NF-}\kappa\text{B}$ transloziert) auf

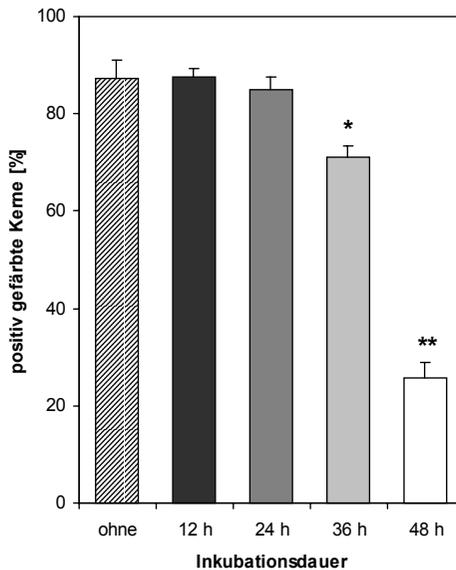


Abb. 4: Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Translokation in HeLa 229-Zellen durch Vorinkubation mit 2 mM Butyrat. Die Ergebnisse mehrerer Versuche sind als Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) angegeben. * $p = 0,001$; ** $p < 0,001$.

84,92 ± 2,61 %. Nach 36stündiger Butyratbehandlung zeigte sich bereits eine signifikante Reduktion der Translokationen auf 71,24 ± 2,22 % verglichen mit den unbehandelten Zellen ($p = 0,001$). Die weitere Inkubation mit Butyrat für insgesamt 48 Stunden führte schließlich zu einer hochsignifikanten Abnahme des Anteils translozierter Zellen auf 25,70 ± 3,18 %. Eine 12stündige Butyrat-Vorbehandlung war demgegenüber nicht ausreichend, eine Translokation von NF- κ B nach TNF α -Stimulation auch nur bei einem Teil der HeLa 229-Zellen zu verhindern. Es waren bei 87,50 ± 1,78 % der Zellen Translokationen nachweisbar (ohne Behandlung 87,22 ± 3,80 %).

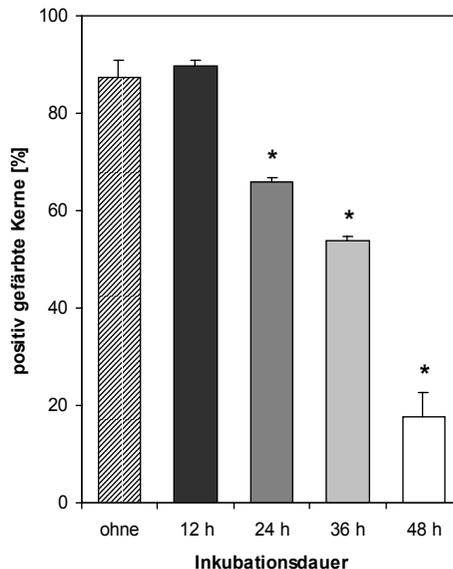


Abb. 5: In HeLa 229-Zellen führt die Vorinkubation mit 4 mM Butyrat zu einer hochsignifikanten Inhibition der durch TNF α provozierten NF- κ B-Translokation. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) angegeben. * $p < 0,001$.

Durch die Präinkubation mit 4 mM Butyrat (*Abb. 5*) ließ sich bereits nach nur 24 Stunden eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Reduktion des Anteils translozierter Zellen auf $65,75 \pm 0,99$ % gegenüber $87,22 \pm 3,80$ % bei unbehandelten HeLa 229-Zellen erzielen. Längere Vorbehandlungsperioden von 36 oder 48 Stunden führten zu einer noch stärker ausgeprägten, ebenfalls hochsignifikanten ($p < 0,001$) Inhibition der Translokation von NF- κ B. So reduzierte sich der Anteil translozierter Zellen nach 36 Stunden auf $53,77 \pm 0,81$ % und nach 48 Stunden auf $17,55 \pm 5,02$ %. Eine Inkubation mit 4 mM Butyrat für 12 Stunden ($89,59 \pm 1,25$ % translozierte Zellen) zeigte wie bei 2 mM Butyrat keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Der Vergleich der Behandlungen mit 2 und 4 mM Butyrat (*Abb. 6*) ergab bei einer 12stündigen Präinkubation keinen signifikanten Unterschied. NF- κ B war nach der Stimulation mit TNF α in $87,50 \pm 1,78$ % (2 mM) bzw. $89,59 \pm 1,25$ % (4 mM) der Zellen nukleär transloziert (ohne Butyratvorbehandlung: $87,22 \pm 3,80$ %). Demgegenüber ließ sich bereits nach 24 Stunden ein signifikanter ($p = 0,004$) Vorteil von 4 mM Butyrat im Vergleich mit 2 mM erkennen. Der Anteil translozierter Zellen reduzierte sich hier auf $65,75 \pm 0,99$ % (4 mM) gegenüber $84,92 \pm 2,61$ % (2 mM). Auch nach 36 Stunden blieb der signifikante ($p = 0,001$) Vorteil der Inkubation mit 4 mM Butyrat verglichen mit 2 mM bestehen. Der Anteil der Zellen, die eine NF- κ B-Translokation zeigten, verringerte sich auf $53,77 \pm 0,81$ % (4 mM) gegenüber $71,24 \pm 2,22$ % (2 mM). Nach einer insgesamt 48stündigen Vorbehandlung der HeLa-229-Zellen ließ sich weiterhin ein leichter jedoch statistisch nicht signifikanter Unterschied zwischen 2 mM ($25,70 \pm 3,18$ %) und 4 mM Butyrat ($17,55 \pm 5,02$ %) nachweisen.

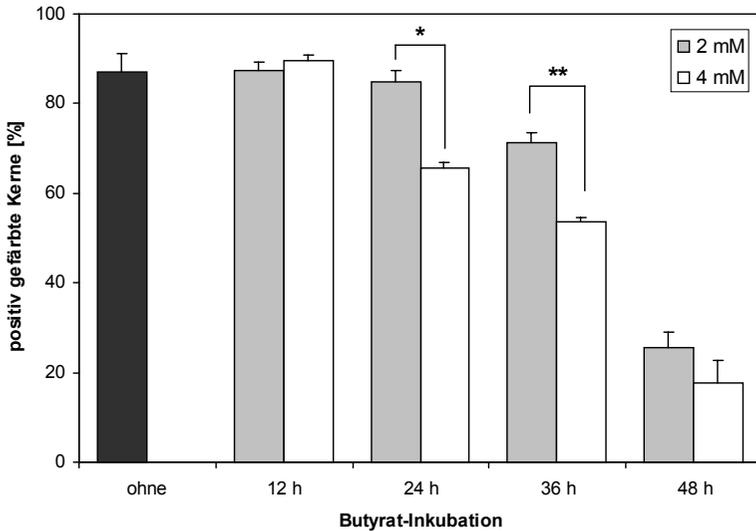


Abb. 6: Eine Inkubation mit 4 mM Butyrat führt in den ersten 36 Stunden zu einer signifikant stärkeren Hemmung der durch $\text{TNF}\alpha$ ausgelösten $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Translokation als mit 2 mM Butyrat. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) angegeben. * $p = 0,004$; ** $p = 0,001$.

3.1.2 Die $\text{IL-1}\beta$ -vermittelte Translokation von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in HeLa 229-Zellen wird durch Butyrat gehemmt

Analog zu den Stimulationen mit $\text{TNF}\alpha$ wurden die Versuche zur Inhibition der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Translokation auch mit $\text{IL-1}\beta$ als Stimulans durchgeführt. In unbehandelten HeLa 229-Zellen (Abb. 7 A) zeigte sich ausschließlich ein fluoreszierendes Zytoplasma mit Aussparung der Kerne, d. h. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ war nicht nukleär transloziert. Ein identisches Bild ließ sich bei den nur mit Butyrat inkubierten Zellen (Abb. 7 D) feststellen.

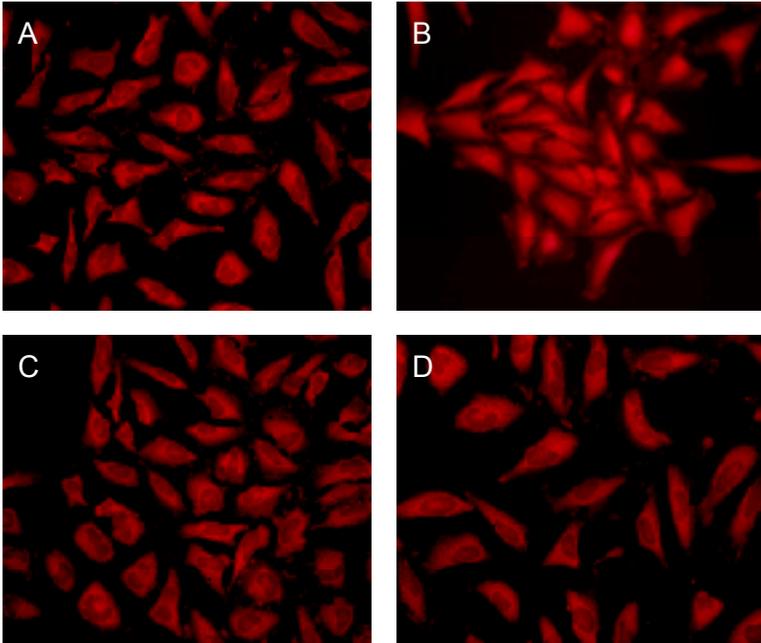


Abb. 7: Butyrat hemmt die IL-1 β -induzierte nukleäre Translokation von NF- κ B (p65). HeLa 229-Zellen blieben unbehandelt (A), wurden mit IL-1 β stimuliert (B), vor der IL-1 β -Stimulation mit Butyrat präinkubiert (C) oder ausschließlich mit Butyrat behandelt (D). Vergrößerung: 62,5fach.

Eine Stimulation für 60 Minuten mit 20 ng/ml IL-1 β führte in nahezu allen HeLa 229-Zellen zu einer Translokation von NF- κ B (p65) aus dem Zytoplasma in den Zellkern (Abb. 7 B). Dieser war nun an seiner gegenüber dem Zellplasma deutlich kräftigeren roten Fluoreszenz zu erkennen. Eine Vorbehandlung der Zellen für 12 bis 48 Stunden mit 2 bzw. 4 mM Butyrat führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Hemmung der IL-1 β -induzierten nukleären Translokation von NF- κ B (Abb. 7 C). Bei diesen Zellen zeigte sich dementsprechend das gleiche Farbverhalten wie in den unstimulierten bzw. unbehandelten Zellen (Abb. 7 A).

Die alleinige Stimulation mit IL-1 β führte bei $85,12 \pm 2,43$ % der He-La 229-Zellen zu einer nukleären Translokation von NF- κ B (p65). Eine Präinkubation mit 2 mM Butyrat (Abb. 8) ergab eine leichte, aber nicht signifikante Verminderung des Anteils aktivierter Zellen auf $81,16 \pm 6,78$ % nach 24 Stunden bzw. $67,98 \pm 1,25$ % nach 36 Stunden. Die Inkubation mit Butyrat für insgesamt 48 Stunden führte zu einer hochsignifikanten Reduktion der NF- κ B-Translokationen auf $23,80 \pm 3,55$ % der Zellen. Eine Inkubation für lediglich 12 Stunden ($88,49 \pm 1,39$ % translozierte Zellen) ergab keine signifikanten Unterschiede gegenüber unbehandelten Zellen.

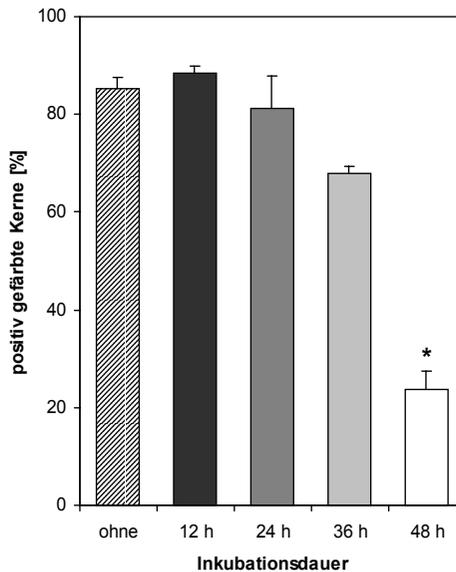


Abb. 8: Eine Vorinkubation mit 2 mM Butyrat führt nach 48 Stunden zu einer hochsignifikanten Inhibition der IL-1 β -induzierten NF- κ B-Translokation. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) angegeben. * $p < 0,001$.

Die Präinkubation der HeLa 229-Zellen mit 4 mM Butyrat (*Abb. 9*) führte erstmalig nach 24 Stunden zu einer leichten Reduktion der IL-1 β -induzierten NF- κ B-Translokationen auf $69,79 \pm 10,25$ % gegenüber $85,12 \pm 2,43$ % bei unbehandelten Zellen. Nach 36stündiger Behandlung kam es zu einer signifikanten ($p = 0,025$) Inhibition der NF- κ B-Translokation. Der Anteil der translozierten Zellen reduzierte sich auf $55,70 \pm 2,00$ %. Durch eine Inkubation der Zellen mit 4 mM Butyrat für insgesamt 48 Stunden ließ sich dieser Anteil nochmals deutlich verringern. Er betrug hier lediglich noch $11,51 \pm 2,86$ %, was gegenüber den unbehan-

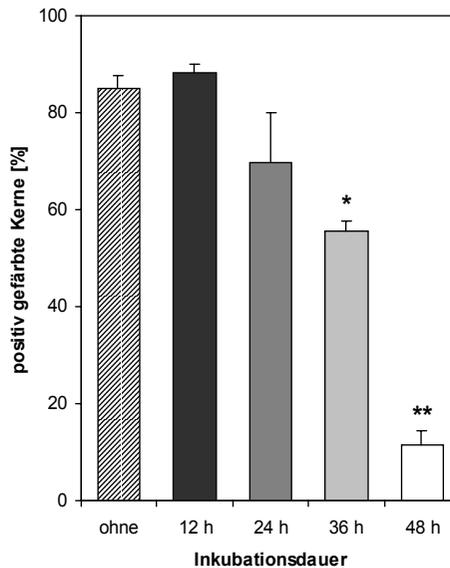


Abb. 9: In HeLa 229-Zellen führt die Präinkubation mit 4 mM Butyrat nach 36 Stunden zu einer signifikanten und nach 48 Stunden hochsignifikanten Inhibition der IL-1 β -induzierten NF- κ B-Translokation. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) angegeben. * $p = 0,025$; ** $p < 0,001$.

delten Zellen einen hochsignifikanten ($p < 0,001$) Unterschied darstellte. Die 12stündige Präinkubation mit 4 mM Butyrat ($88,25 \pm 1,65$ %) war nicht ausreichend, eine Translokation nach Stimulation mit IL-1 β zu verhindern.

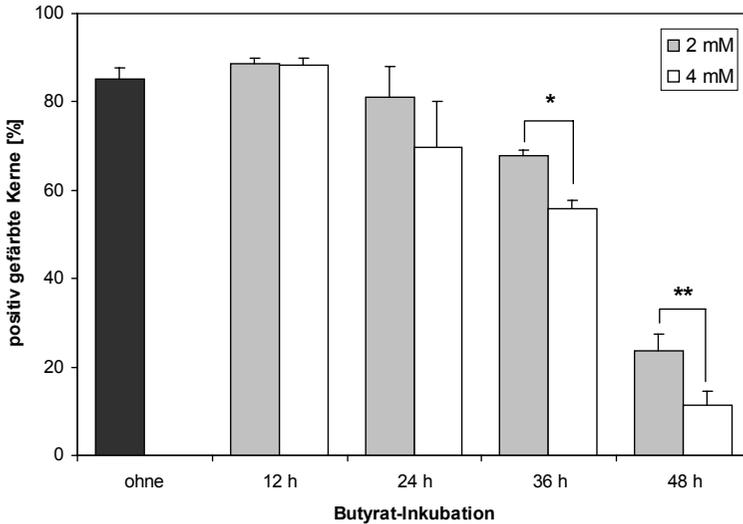


Abb. 10: Eine Inkubation mit 4 mM Butyrat führt zu einer signifikant stärkeren Hemmung der durch IL-1 β ausgelösten NF- κ B-Translokation als mit 2 mM Butyrat. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) angegeben. * $p = 0,047$; ** $p = 0,029$

Beim Vergleich der Behandlungen mit 2 mM und 4 mM Butyrat (Abb. 10) zeigte sich bei einer Vorinkubation für 12 Stunden kein signifikanter Unterschied. NF- κ B war nach der Stimulation mit IL-1 β in $88,49 \pm 1,39$ % (2 mM) bzw. $88,25 \pm 1,65$ % (4 mM) der Zellen nukleär transloziert (ohne Butyratvorbehandlung: $85,12 \pm 2,43$ %). Nach einer 24stündigen Vorbe-

handlung der Zellen wurde ein Unterschied zwischen den Behandlungen mit 2 mM ($81,16 \pm 6,87 \%$) und 4 mM Butyrat ($69,79 \pm 10,25 \%$) erkennbar, dieser war jedoch nicht signifikant. Demgegenüber ergab sich nach längerer Inkubation für insgesamt 36 Stunden ein signifikanter ($p = 0,047$) Vorteil für die Inkubation mit 4 mM Butyrat ($55,70 \pm 2,00 \%$) im Vergleich mit 2 mM ($67,98 \pm 1,25 \%$). Auch nach einer 48stündigen Behandlung blieb der signifikante ($p = 0,029$) Vorteil für 4 mM Butyrat verglichen mit 2 mM bestehen. Der Anteil translozierter HeLa 229-Zellen verringerte sich auf $11,51 \pm 2,86 \%$ (4 mM) gegenüber $23,80 \pm 3,55 \%$ (2 mM).

3.1.3 Inhibition der NF- κ B-Translokation durch Butyrat in den kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480 und SW620

Analog den Versuchen an HeLa 229-Zellen wurden die Experimente ebenfalls an den kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480 (*Abb. 11*) und SW620 (*Abb. 12*) durchgeführt. In beiden Zelllinien zeigte sich dabei ein identisches, den HeLa 229-Zellen entsprechendes Verhalten:

In unbehandelten Zellen war nur im Bereich des Zytoplasmas eine rötliche Fluoreszenz feststellbar. Die Kerne blieben ausgespart, d. h. NF- κ B war nicht nukleär transloziert, die Zellen nicht aktiviert (*Abb. 11 A, Abb. 12 A*). Ein ähnliches Färbeverhalten zeigte sich bei den nur mit Butyrat inkubierten Zellen (*Abb. 11 D, Abb. 12 D*). Die 60minütige Stimulation mit 1000 U/ml TNF α ergab in nahezu allen Zellen eine Translokation von NF- κ B, zu erkennen an der kräftig roten Fluoreszenz des Kernes (*Abb. 11 B, Abb. 12 B*). Eine Vorbehandlung der SW480- und SW620-Zellen für 24

Stunden mit 2 bzw. 4 mM Butyrat führte zu einer Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Translokation in den Kern (Abb. 11 C, Abb. 12 C). Dementsprechend zeigte sich das gleiche Färbeverhalten wie in unstimulierten Zellen. Stimulationsversuche mit 20 ng/ml $\text{IL-1}\beta$ führten bei den mit 2 mM und 4 mM Butyrat über 24 Stunden vorbehandelten SW480- und SW620-Zellen zu gleichen Ergebnissen wie die zuvor beschriebenen Stimulationen mit 1000 U/ml $\text{TNF}\alpha$.

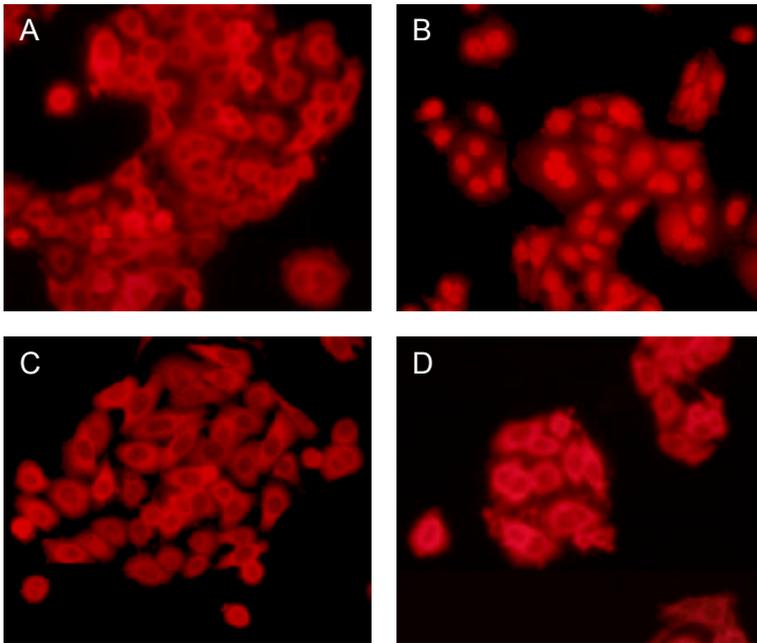


Abb. 11: Butyrat hemmt die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte nukleäre Translokation von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in SW480-Zellen. Die Zellen blieben unbehandelt (A), wurden mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert (B), vor der $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation mit Butyrat präinkubiert (C) oder ausschließlich mit Butyrat behandelt (D). Vergrößerung: 62,5fach.

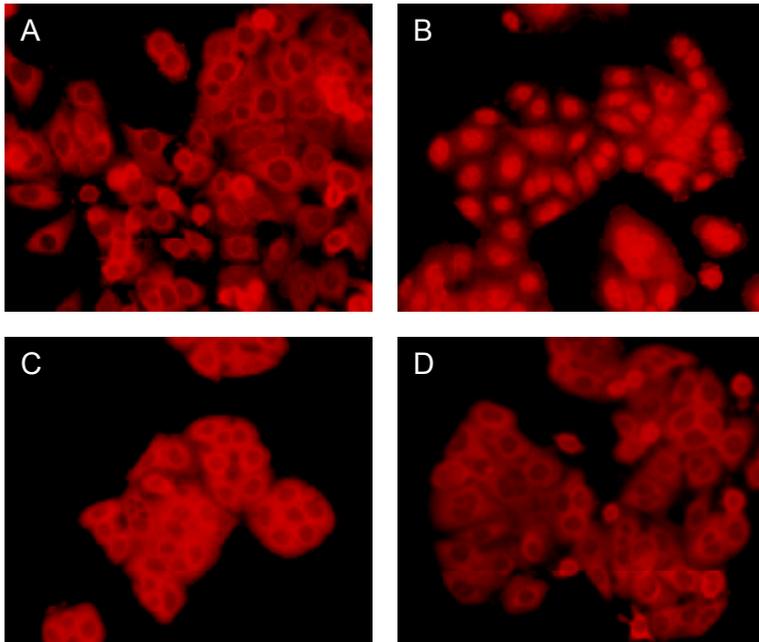


Abb. 12: Die TNF α -induzierte nukleäre Translokation von NF- κ B wird durch Butyrat gehemmt. SW620-Zellen blieben unbehandelt (A), wurden mit TNF α stimuliert (B), vor der TNF α -Stimulation mit Butyrat präinkubiert (C) oder ausschließlich mit Butyrat behandelt (D). Vergrößerung: 62,5fach.

3.2 Western Blot-Untersuchungen an Zelllinien

Ergänzend zu den Befunden aus der Immunfluoreszenzmarkierung von NF- κ B (p65) wurde die Wirkung von Butyrat auf die Expression des inhibitorischen I κ B α -Proteins sowie dessen Phosphorylierung in einem Western Blot-System untersucht. Auch hier dienten die Zelllinien HeLa 229, SW480

und SW620 als *in vitro*-Modelle. Nach einer Wachstumsphase von ca. 72 Stunden sowie Synchronisation der Zellen durch Serumentzug für 6 Stunden erfolgte eine Vorinkubation mit 4 mM Butyrat über einen Zeitraum von 12, 24 und 48 Stunden. Anschließend wurden die Präparate für 2, 10 und 30 Minuten mit 2000 U/ml TNF α (HeLa 229, SW480, SW620) oder 20 ng/ml IL-1 β (HeLa 229) stimuliert. Ähnlich den Ergebnissen der Immunfluoreszenz zeigte sich nach 12stündiger Vorinkubation mit Butyrat keine effektive Inhibition der Phosphorylierung von I κ B α . Diese ließ sich nur nach einer Butyrat-Behandlung für 24 bzw. 48 Stunden nachweisen.

3.2.1 Butyrat inhibiert in HeLa 229-Zellen die durch TNF α vermittelte Phosphorylierung des inhibitorischen I κ B α -Proteins

Zunächst wurde das intrazellulär vorhandene I κ B α (Abb. 13 A) durch Markierung mit einem spezifischen Antikörper untersucht. Hier führte die Stimulation mit 2000 U/ml TNF α in unbehandelten HeLa 229-Zellen bereits nach 2 Minuten zu einer schnellen Phosphorylierung von I κ B α (Abb. 13 A, Bahn 1 - 4), erkennbar an der Abnahme bzw. dem vollständigen Verschwinden der Bande für I κ B α (Abb. 13 A, Bahn 2). 10 und 30 Minuten nach der TNF α -Stimulation war ebenfalls kein I κ B α mehr nachweisbar (Abb. 13 A, Bahn 3 + 4). Nach einer Vorbehandlung der Zellen mit 4 mM Butyrat (für 24 bzw. 48 Stunden) war die Abnahme des I κ B α -Proteins nach TNF α -Stimulation deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 13 A, Bahn 5 - 8), hier war auch nach 30 Minuten noch ein Rest von I κ B α vorhanden. Analog hierzu ließen sich entsprechende Ergebnisse für den Nachweis von

Phospho-I κ B α erheben (Abb. 13 B). Mittels der spezifischen Antikörpermarkierung von Phospho-I κ B α an den Serinresten 32 und 36 war in unbehandelten und nur mit TNF α stimulierten Zellen nach 2 Minuten eine deutliche Zunahme von Phospho-I κ B α zu erkennen (Abb. 13 A, Bahn 6). Das Phospho-I κ B α -Protein blieb auch nach 10 Minuten noch deutlich nach-

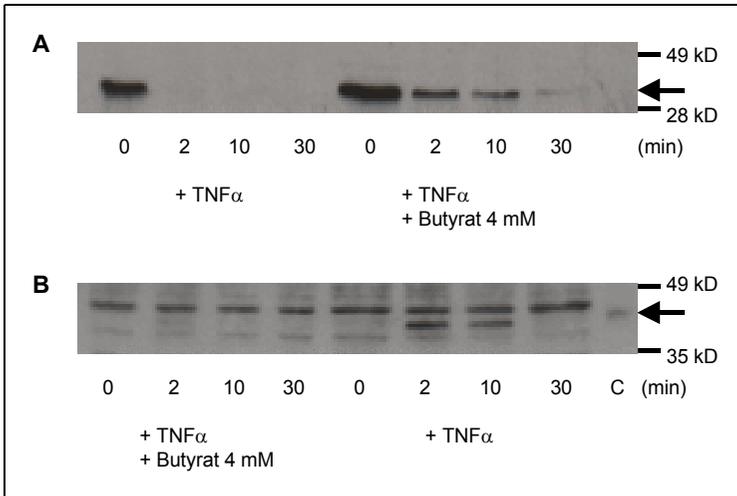


Abb. 13: Butyrat (4 mM, 24 h) inhibiert die TNF α -vermittelte Phosphorylierung von I κ B α in HeLa 229-Zellen. Markierung von I κ B α (A, \leftarrow) und Phospho-I κ B α (B, \leftarrow) mittels spezifischer Antikörper. Bahn 9 zeigt jeweils die Positivkontrolle (C).

weisbar (Abb. 13 B, Bahn 7), nach einer 30minütigen TNF α -Stimulation waren allerdings nur noch Spuren zu sehen (Abb. 13 B, Bahn 8). Wurden die HeLa 229-Zellen zuvor mit 4 mM Butyrat inkubiert (für 24 bzw. 48 Stunden), konnte nach Stimulation mit TNF α kein Phospho-I κ B α nachgewiesen

werden (*Abb. 13 B, Bahn 1 – 4*). Eine Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ war demnach wirkungsvoll unterdrückt worden. Beim Vergleich der Inkubationszeiten ließ sich bereits nach 24 Stunden ein optimaler Effekt feststellen. Dieser war durch eine längere Inkubation von bis zu 48 Stunden nicht mehr zu steigern.

3.2.2 Butyrat hemmt die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in den Zelllinien SW480 und SW620

Analog den Western Blot-Versuchen an HeLa 229-Zellen wurden diese an den kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480 und SW620 durchgeführt (*Abb. 14, Abb. 15*). Hierbei wurde ebenfalls zunächst das intrazellulär vorhandene $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein (*Abb. 14 A, Abb. 15 A*) durch eine spezifische Antikörpermarkierung sichtbar gemacht. Nach der Stimulation mit 2000 U/ml $\text{TNF}\alpha$ ließ sich in unbehandelten SW480- (*Abb. 14 A, Bahn 1 - 4*) bzw. SW620-Zellen (*Abb. 15 A, Bahn 1 - 4*) auch hier bereits nach 2 Minuten die beginnende Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nachweisen. Diese zeigte sich zwar nicht so beeindruckend ausgeprägt wie in HeLa 229-Zellen, war aber auch sehr deutlich an der Intensitätsabnahme der Bande für $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu erkennen (*Abb. 14 A, Abb. 15 A, Bahn 2*). Bei einer Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ für 10 bzw. 30 Minuten ließen sich diese Ergebnisse bis zum nahezu vollständigen Verschwinden der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Banden steigern (*Abb. 14 A, Abb. 15 A, Bahn 3 + 4*).

Eine Vorbehandlung der SW480- (*Abb. 14 A, Bahn 5 - 8*) und SW620-Zellen (*Abb. 15 A, Bahn 5 - 8*) mit 4 mM Butyrat für 24 bzw. 48 Stunden führte dagegen nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ zu keiner deutlichen Reduktion

des $I\kappa B\alpha$ -Proteins (*Abb. 14 A, Abb. 15 A, Bahn 5 - 8*). Hier waren nur geringe Schwankungen der Intensität nachzuweisen, klare Tendenzen dabei jedoch nicht eindeutig erkennbar.

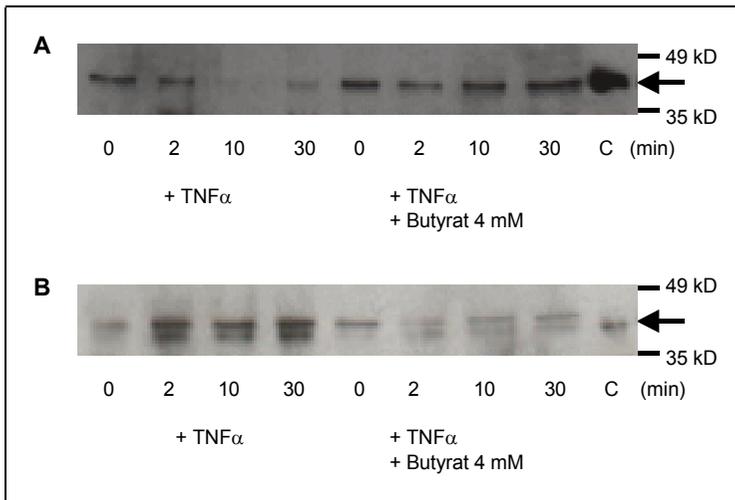


Abb. 14: Butyrat (4 mM, 24 h) inhibiert die $TNF\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ in SW480-Zellen. Markierung von $I\kappa B\alpha$ (A, \leftarrow) und Phospho- $I\kappa B\alpha$ (B, \leftarrow) mittels spezifischer Antikörper. Bahn 9 zeigt jeweils die Positivkontrolle (C).

Mit den Erkenntnissen bezüglich des inhibitorischen $I\kappa B\alpha$ -Proteins korrelierende Ergebnisse ließen sich beim Nachweis von Phospho- $I\kappa B\alpha$ aufzeigen (*Abb. 14 B, Abb. 15 B*). In unbehandelten und nur mit 2000 U/ml $TNF\alpha$ stimulierten SW480- (*Abb. 14 B*) und SW620-Zellen (*Abb. 15 B*) war nach 2 Minuten eine deutliche Zunahme von Phospho- $I\kappa B\alpha$ erkennbar (*Abb. 14, Abb. 15, Bahn 2*). Die Bande für Phospho- $I\kappa B\alpha$ blieb, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt, nach 10 Minuten erhalten (*Abb. 14, Abb. 15, Bahn 3*).

und zeigte nach 30 Minuten (*Abb. 14, Abb. 15, Bahn 4*) nahezu die gleiche Intensität wie nach einer 2minütigen $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation. Diese Unterschiede der Kolonkarzinomzellen SW480 und SW620 gegenüber der Zervixkarzinomzelllinie HeLa 229, bei der sich nach 30 Minuten nur noch Spuren von Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nachweisen ließen, liegen möglicherweise in den unter-

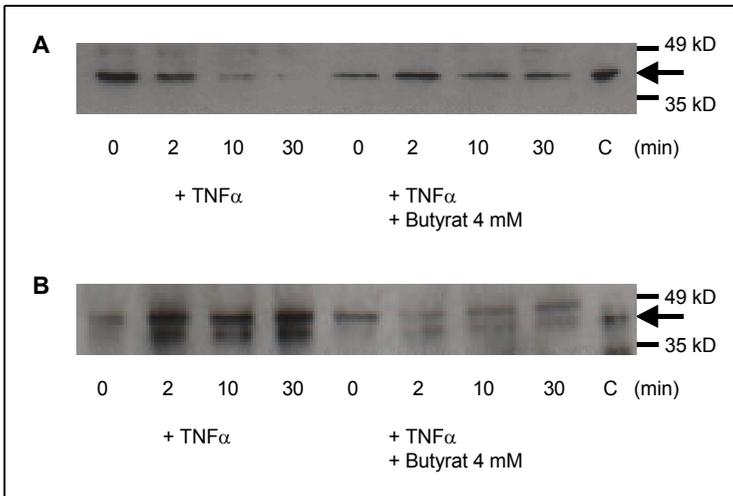


Abb. 15: Butyrat (4 mM, 24 h) inhibiert die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in SW620-Zellen. Markierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (A, \leftarrow) und Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (B, \leftarrow) mittels spezifischer Antikörper. Bahn 9 zeigt jeweils die Positivkontrolle (C).

schiedlichen Stoffwechseleigenschaften begründet. Wurden die SW480- und SW620-Zellen vor der Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ mit 4 mM Butyrat inkubiert (für 24 bzw. 48 Stunden), konnten kein bzw. nur erheblich geringere Mengen von Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ verglichen mit unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (*Abb. 14 B, Abb. 15 B, Bahn 5 – 8*). Eine Phosphorylierung

von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ war dementsprechend durch eine Vorinkubation der Zellen wirkungsvoll unterdrückt worden.

Beim Vergleich der Inkubationszeiten ließ sich sowohl in SW480- als auch in SW620-Zellen bereits nach einer 24stündigen Butyrat-Behandlung ein optimaler Effekt erzielen. Dieser ließ sich durch eine Verlängerung der Inkubation auf bis zu 48 Stunden nicht mehr verbessern.

3.2.3 Butyrat inhibiert nicht die $\text{IL-1}\beta$ -vermittelte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Phosphorylierung in der Zelllinie HeLa 229

Auch hier wurde zunächst das inhibitorische $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein (*Abb. 16 A*) durch Markierung mit einem spezifischen Antikörper untersucht. Dabei führte die Stimulation mit 20 ng/ml $\text{IL-1}\beta$ für 2 Minuten in unbehandelten HeLa 229-Zellen zu einer schnellen Abnahme der intrazellulär vorhandenen Menge an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (*Abb. 16 A, Bahn 2*). Interessanterweise ließ sich diese Reduktion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ auch noch nach 10 Minuten (*Abb. 16 A, Bahn 3*) nachweisen, nicht jedoch nach 30 Minuten. Hier zeigte sich in der entsprechenden Bande ungefähr die initiale Proteinmenge vor $\text{IL-1}\beta$ -Stimulation (*Abb. 16 A, Bahn 4*). In mit 4 mM Butyrat für 24 Stunden vorbehandelten HeLa 229-Zellen war die Abnahme des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins nach $\text{IL-1}\beta$ -Stimulation ungefähr vergleichbar mit unbehandelten Zellen (*Abb. 16 A, Bahn 5 - 8*). Eine Ausnahme stellte dabei jedoch der 30 Minuten-Wert dar, bei dem eine deutlich geringere Intensität der Bande für $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu erkennen war (*Abb. 16 A, Bahn 8*). Eine Vorbehandlung mit 4 mM Butyrat über 24 Stunden resultierte in einer geringeren Abnahme von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (*Abb. 16 A, Bahn 5*) verglichen mit unbehandelten Zellen (*Abb. 16 A, Bahn 1*).

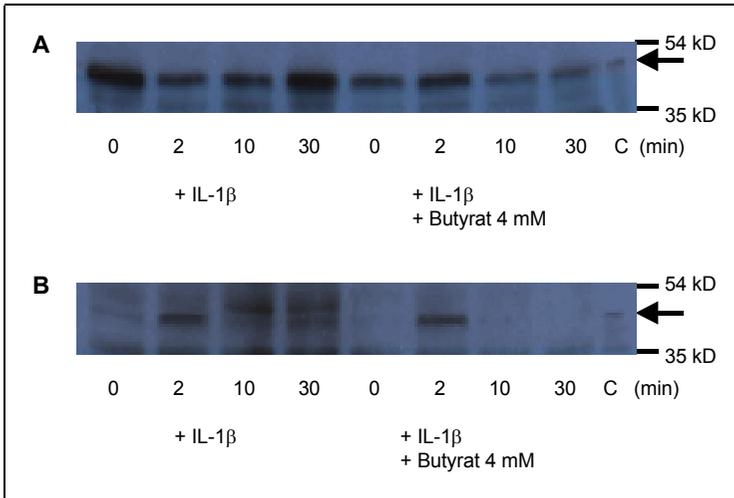


Abb. 16: Butyrat (4 mM, 24 h) inhibiert nicht die IL-1 β -vermittelte Phosphorylierung von I κ B α in HeLa 229-Zellen. Markierung von I κ B α (A, \leftarrow) und Phospho-I κ B α (B, \leftarrow) mittels spezifischer Antikörper. Bahn 9 zeigt jeweils die Positivkontrolle (C).

Bei der Untersuchung von Phospho-I κ B α (Abb. 16 B) zeigte sich in unbehandelten Zellen bei der Stimulation mit 20 ng/ml IL-1 β nach 2 Minuten eine deutliche und schnelle Zunahme des phosphorylierten I κ B α -Proteins (Abb. 16 B, Bahn 2). Eine längere IL-1 β -Stimulation für 10 bzw. 30 Minuten führte zu keiner weiteren Zunahme von Phospho-I κ B α sondern zu einer Abnahme des Proteins (Abb. 16 B, Bahn 6 + 7). Ein identisches Verhalten war interessanterweise bei den mit 4 mM Butyrat (24 h) vorbehandelten HeLa 229-Zellen festzustellen. Nach Stimulation mit IL-1 β zeigte sich hier ebenfalls der Peak nach 2 Minuten, anschließend war keine erneute bzw. weitere Erhöhung von Phospho-I κ B α nachweisbar (Abb. 16 B, Bahn 5 - 8).

3.3 Untersuchungen an Biopsien von Patienten mit aktiver distaler Colitis ulcerosa

3.3.1 Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in Lamina propria-Makrophagen durch die topische Behandlung mit Butyrat

Zunächst wurde an Biopsien gesunder Probanden, unbehandelter sowie mit Butyrat bzw. Placebo behandelter Colitis ulcerosa-Patienten eine Immunfluoreszenzfärbung von NF- κ B (p65) durchgeführt (*Abb. 17*). Hierbei fiel in den Gewebeproben der unbehandelten Patienten (*Abb. 17 B*) eine Ansammlung von Zellen in der Lamina propria auf. Diese zeigten eine deutliche nukleäre Fluoreszenz, d. h. es mußte eine Translokation bzw. Aktivierung von NF- κ B (p65) stattgefunden haben. Bei der Betrachtung von Biopsien gesunder Probanden (*Abb. 17 A*) ließen sich diese Zellen nicht nachweisen. In den Gewebeproben der Patienten, die Placebo in Form einer isoosmolaren Natriumchloridlösung erhielten (*Abb. 17 C*), zeigten sich ähnliche Anhäufungen von Zellen in der Lamina propria wie in der Gruppe unbehandelter Patienten. In den Biopsien der mit 100 mM Butyrat behandelten Patienten (*Abb. 17 D*) waren keine Translokationen von NF- κ B nachweisbar. Zytoplasmatisches NF- κ B wurde dabei zum einen durch die Hintergrundaktivität des Cy3[™]-gekoppelten Sekundärantikörpers und zum anderen durch das ubiquitäre Vorkommen von NF- κ B überdeckt. Die Behandlung mit 100 mM Butyrat in Form von Klistieren war somit in der Lage, die nukleäre Translokation von NF- κ B in Zellen der Lamina propria gegenüber Placebo wirkungsvoll zu hemmen.

Aufgrund der Daten von Rogler et al. [150] bezüglich der Aktivierung von NF- κ B in Lamina propria-Makrophagen im Rahmen einer Colitis ulcerosa

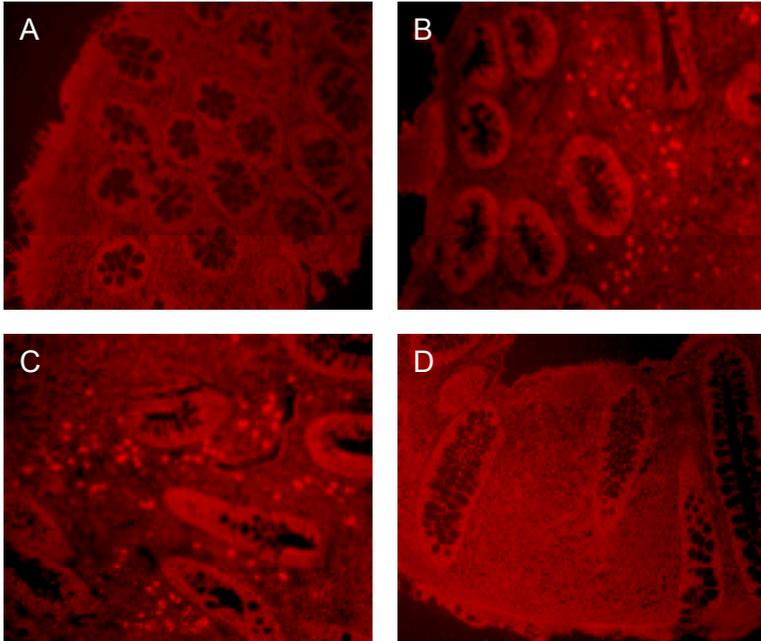


Abb. 17: Immunfluoreszenzmarkierung von NF- κ B (p65) an Biopsien. Die Bilder zeigen normale Mukosa (A), Mukosa eines unbehandelten (B), Mukosa eines mit Placebo- (C) und eines mit Butyrat behandelten Colitis ulcerosa-Patienten (D). Vergrößerung: 62,5fach.

lag der Verdacht nahe, daß es sich bei den mittels Immunfluoreszenz markierten Zellen ebenfalls um Lamina propria-Makrophagen handeln könnte. Zur genaueren Spezifizierung der Zellen wurde eine immunenzymatische Doppelmarkierung durchgeführt. Mittels eines Antikörpers gegen CD68 konnten die Zellen in der Lamina propria zuverlässig als Makrophagen identifiziert werden. Gebundener CD68-Antikörper resultierte in einer blauen Färbung des Zytoplasmas. Zusätzlich wurden die Biopsien mit einem Antikörper gegen NF- κ B (p65) gegengefärbt, die Bindung des Antikörpers war durch eine rote Färbung erkennbar. In Biopsien gesunder

Probanden (*Abb. 18 A*) ließen sich Makrophagen in der Lamina propria nachweisen, welche deutlich an ihrem blauen Zytoplasma zu erkennen waren. Die Kerne dieser Makrophagen waren nicht rötlich angefärbt, d. h. NF- κ B war nur im Zytoplasma vorhanden (vom blauen Farbstoff überlagert) und nicht nukleär transloziert. Bei Betrachtung der Patienten-Gruppe vor Behandlungsbeginn (*Abb. 18 B*) zeigte sich eine Aktivierung der Lamina propria-Makrophagen, zu erkennen an der deutlichen Rotfärbung der Kerne, d. h. NF- κ B war hier nukleär transloziert. Ein identisches Färbever-

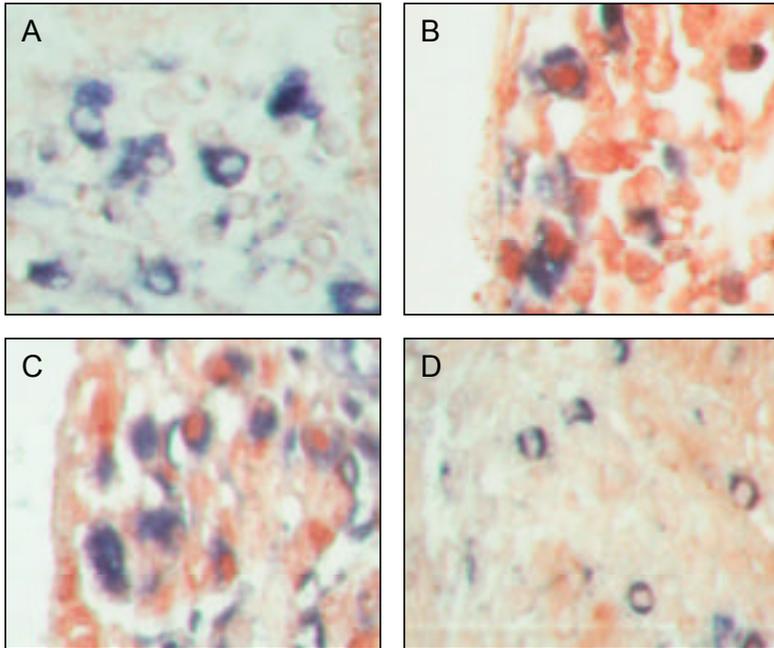


Abb. 18: Immunenzymatische Doppelmarkierung von NF- κ B (p65, rot) und Lamina propria-Makrophagen (CD68, blau). Die Biospien stammen von gesunden Probanden (A), von Colitis ulcerosa-Patienten vor Therapiebeginn (B), nach 4wöchiger Behandlung mit Placebo (C) oder Butyrat (D). Vergrößerung: 250fach.

halten ließ sich ebenfalls für die Placebo-Gruppe nachweisen (*Abb. 18 C*), hier erhielten die Patienten über einen Zeitraum von 4 Wochen eine isoosmolare Kochsalzlösung. In der Verum-Gruppe (100 mM Butyrat über 4 Wochen) waren nahezu die gleichen Befunde wie bei gesunden Probanden zu erheben (*Abb. 18 D*). Die Lamina propria-Makrophagen zeigten nahezu keine nukleären Translokationen von NF- κ B, die Kerne waren dementsprechend nicht rot angefärbt.

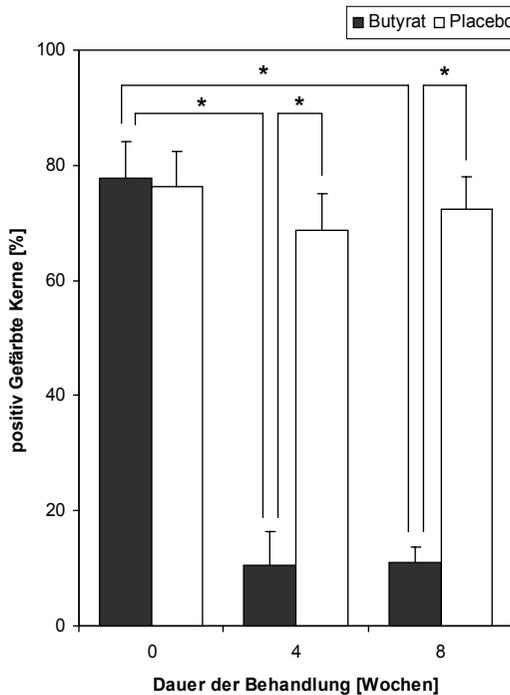


Abb. 19: Butyrat hemmt signifikant die NF- κ B-Translokation in Lamina propria-Makrophagen im Vergleich mit Ausgangswerten und Placebo. Die Ergebnisse mehrerer Versuche sind in Prozent NF- κ B-positiver Kerne als Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) angegeben. * $p < 0,001$.

Durch die lokale Behandlungen der Colitis ulcerosa-Patienten mit 100 mM Butyrat oder Placebo (*Abb. 19*) ließ sich bereits nach 4 Wochen eine hochsignifikante Abnahme des Anteils aktivierter Lamina-propria-Makrophagen (NF- κ B im Kern) auf $10,52 \pm 3,32$ % in der Butyrat-Gruppe gegenüber $77,71 \pm 3,71$ % vor Therapiebeginn erzielen. Diese Reduktion war ebenfalls hochsignifikant ($p < 0,001$) im Vergleich mit der Placebo-Gruppe, bei der ein Anteil von $68,67 \pm 3,74$ % der Makrophagen aktiviert war.

Eine Fortführung der Butyrat-Behandlung für weitere 4 Wochen (insgesamt 8 Wochen) führte zu keiner weiteren signifikanten Reduktion des Anteils aktivierter Makrophagen ($11,09 \pm 1,53$ %). Gegenüber Therapiebeginn war die Abnahme des Anteils aktivierter Makrophagen nach 8 Wochen jedoch auch hier hochsignifikant ($p < 0,001$), ebenso im Vergleich mit der Placebo-Gruppe ($73,07 \pm 3,23$ %). Insgesamt waren in der Placebo-Gruppe während des Untersuchungszeitraums von 8 Wochen keine wesentlichen Änderungen gegenüber dem Ausgangsbefund zu erheben.

3.3.2 Disease Activity Index

Die Reaktion der Patienten auf die Butyratbehandlung wurde klinisch mittels des Disease Activity Index nach Sutherland jeweils vor Therapiebeginn sowie nach 4 und 8 Wochen beurteilt (*Abb. 20*:).

Jeder der 11 in die Studie aufgenommenen Patienten beendete erfolgreich die 8wöchige Untersuchungsperiode. Darüber hinaus konnten während dieser Zeit keine therapieabhängigen Nebeneffekte beobachtet werden. Bei Betrachtung der Butyrat-Gruppe zeigte sich bereits nach einer Behandlung für 4 Wochen eine signifikante Abnahme ($p = 0,011$) der durchschnittlichen

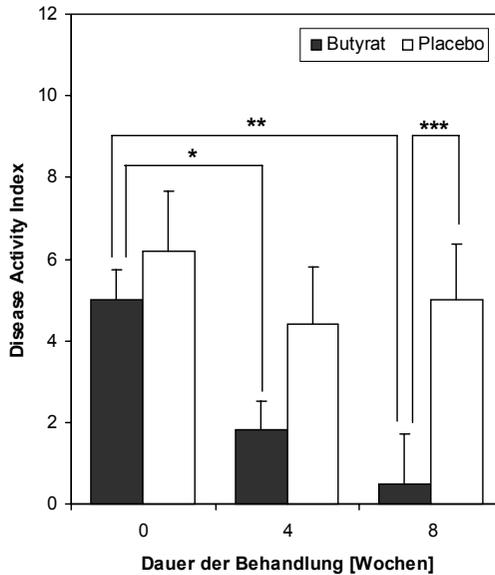


Abb. 20: Einläufe mit Butyrat verringern signifikant den Wert des Disease Activity Index verglichen mit Ausgangswerten sowie Placebo. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) angegeben. * $p = 0,011$; ** $p = 0,001$; *** $p = 0,009$.

DAI-Werte auf $1,83 \pm 0,70$ verglichen mit $5,00 \pm 0,73$ vor Therapiebeginn. Bei Fortführung der Behandlung für insgesamt 8 Wochen ließ sich eine weitere Reduktion des DAI auf $0,50 \pm 0,50$ erzielen. Diese war signifikant ($p = 0,001$) im Vergleich zu den Ausgangswerten, nicht jedoch zu den Werten nach 4 Wochen. Die Veränderungen des DAI innerhalb der Placebo-Gruppe waren nicht signifikant. Beim Vergleich der Butyrat- mit der Placebo-Gruppe zeigte sich erst nach einer Behandlungszeit von 8 Wochen eine signifikante ($p = 0,009$) Besserung der DAI-Werte. Die Unterschiede vor Therapiebeginn sowie nach 4 Wochen zwischen Butyrat- und Placebo-

Gruppe waren nicht signifikant. Die Behandlung ausschließlich mit Placebo führte bei den Patienten zu keiner deutlichen Verbesserung des DAI.

3.3.3 Endoskopie-Score

Parallel zur klinischen Einschätzung der Erkrankungsaktivität wurde die makroskopische Erscheinung der Mukosa mittels eines endoskopischen Scores vor Therapiebeginn, nach 4 und 8 Wochen beurteilt (Abb. 21:). Die Ausgangswerte waren nahezu identisch: $6,00 \pm 0,63$ in der Butyrat- und

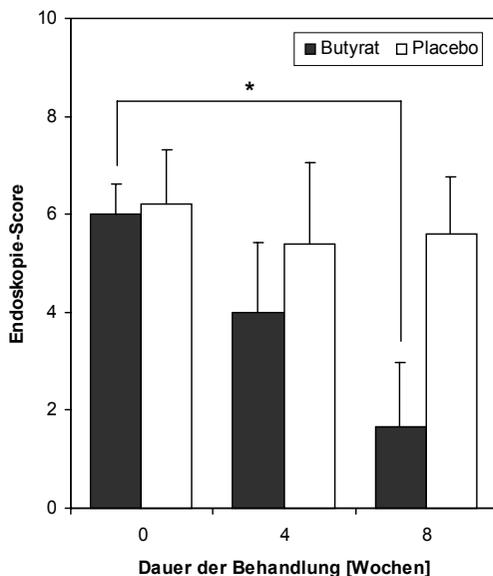


Abb. 21: Die Behandlung mit Butyrat für 8 Wochen senkt signifikant (* $p = 0,007$) Harig's Endoskopie-Score. Mittelwert (Säule) und Standardfehler (Fehlerbalken) sind angegeben.

6,20 ± 1,11 in der Placebo-Gruppe. Eine Behandlung für 4 Wochen mit Butyrat führte zu keiner bemerkenswerten Abnahme des Scores auf 4,00 ± 1,41. Bei einer 8wöchigen Therapie ließ sich in der Butyratgruppe eine weitere, verglichen mit den Ausgangswerten signifikante ($p = 0,007$) Reduktion des endoskopischen Scores auf 1,67 ± 1,31 erzielen. Interessanterweise zeigten sich beim direkten Vergleich der Butyrat- mit der Placebo-Gruppe nach 4 Wochen keine signifikanten Unterschiede. Die Werte nach 8 Wochen verfehlten ebenfalls, wenn auch knapp ($p = 0,052$) das statistische Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Durch die alleinige Gabe von Placebo wurde keine bemerkenswerte Verbesserung der Werte des Endoskopie-Scores erreicht.

3.3.4 Histologischer Score

Zusätzlich zu den klinischen und endoskopischen Parametern sowie der Immunhistochemie wurden detaillierte Untersuchungen histologischer Veränderungen der Kolonmukosa durchgeführt (*Tab. 3*). Die Beurteilung der mit Hämalaun-Eosin gefärbten Biopsien erfolgte jeweils vor Beginn der Applikation von Butyrat, nach 4 Wochen und nach 8 Wochen. Vor Behandlungsbeginn ließen sich die typischen Befunde einer aktiven Colitis ulcerosa erheben: Kryptenabszesse, erhöhte Zahlen von Neutrophilen und Lymphozyten sowie Ulzerationen der Mucosa und Submucosa. Nach einer Therapiedauer von 4 Wochen (*Tab. 3*) zeigten sich sowohl in der Butyrat- als auch in der Placebo-Gruppe deutliche Veränderungen des Scores, diese waren jedoch weder beim Vergleich innerhalb der Gruppen noch mit der anderen Behandlungsform signifikant.

Tab. 3: Untersuchung der histologischen Veränderungen in der Kolonmukosa von Patienten mit distaler Colitis ulcerosa. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

	vor Therapie- beginn	nach 4 Wochen	nach 8 Wochen
Gesamtveränderungen			
Ulzerationen			
Butyrat	0,60 \pm 0,40	0	0,10 \pm 0,10
Placebo	0,70 \pm 0,26	0,50 \pm 0,31	0,40 \pm 0,22
Kryptenabszesse			
Butyrat	0,80 \pm 0,25	0,60 \pm 0,34	0,30 \pm 0,21
Placebo	1,10 \pm 0,31	0,40 \pm 0,16	0,90 \pm 0,23
Kryptenarchitektur			
Butyrat	1,50 \pm 0,22	1,30 \pm 0,15	1,20 \pm 0,13
Placebo	1,20 \pm 0,13	1,10 \pm 0,18	1,10 \pm 0,18
Lamina propria			
Neutrophile			
Butyrat	1,00 \pm 0,29	0,60 \pm 0,22	0,40 \pm 0,22
Placebo	1,30 \pm 0,21	0,90 \pm 0,31	1,40 \pm 0,34
Lymphozyten und Plasmazellen			
Butyrat	2,00 \pm 0,21*	1,60 \pm 0,22	1,40 \pm 0,16*
Placebo	2,20 \pm 0,29	1,80 \pm 0,25	1,90 \pm 0,28
Lymphfollikel			
Butyrat	0,60 \pm 0,22	0,80 \pm 0,20	0,90 \pm 0,18
Placebo	1,20 \pm 0,25	0,80 \pm 0,25	1,40 \pm 0,27
Oberflächenepithel			
Epithelhöhe			
Butyrat	1,60 \pm 0,31	1,60 \pm 0,22	1,30 \pm 0,15
Placebo	1,50 \pm 0,22	0,90 \pm 0,35	1,30 \pm 0,21
Dichte der Basophilen			
Butyrat	1,50 \pm 0,37	1,20 \pm 0,25	0,80 \pm 0,33
Placebo	1,50 \pm 0,22	1,50 \pm 0,31	1,60 \pm 0,27
Größe der Schleimvakuolen			
Butyrat	1,90 \pm 0,35	1,50 \pm 0,34	1,30 \pm 0,30
Placebo	1,80 \pm 0,33	1,40 \pm 0,40	1,60 \pm 0,22
Dichte der Neutrophilen			
Butyrat	0,80 \pm 0,25	0,50 \pm 0,22	0,30 \pm 0,21**
Placebo	1,30 \pm 0,30	1,00 \pm 0,30	1,30 \pm 0,26**
Kryptenepithel			
Epithelhöhe			
Butyrat	1,40 \pm 0,34***	0,90 \pm 0,28	0,70 \pm 0,21***
Placebo	1,00 \pm 0,21	0,70 \pm 0,21	0,90 \pm 0,18
Dichte der Basophilen			
Butyrat	1,30 \pm 0,40	1,30 \pm 0,21	1,00 \pm 0,21
Placebo	1,90 \pm 0,23	1,40 \pm 0,31	1,80 \pm 0,25
Größe der Schleimvakuolen			
Butyrat	1,50 \pm 0,37	1,20 \pm 0,25	1,10 \pm 0,23
Placebo	1,40 \pm 0,27	1,30 \pm 0,37	1,50 \pm 0,27
Dichte der Neutrophilen			
Butyrat	1,20 \pm 0,36	0,70 \pm 0,26	0,40 \pm 0,27****
Placebo	1,00 \pm 0,21	1,00 \pm 0,33	1,30 \pm 0,26****

* p = 0,018; ** p = 0,021; *** p = 0,038; **** p = 0,044

Anders dagegen waren die Ergebnisse nach einer Gesamtbehandlungszeit von 8 Wochen (Tab. 3). Hier zeigte sich zum einen im Oberflächenepithel ($p = 0,021$), zum anderen aber auch im Kryptenepithel ($p = 0,044$) ein signifikanter Rückgang der Neutrophilenzahlen verglichen mit der Placebo-behandlung. Zusätzlich waren die Lymphozyten und Plasmazellen in der Lamina propria gegenüber der Untersuchung vor Behandlungsbeginn signifikant reduziert ($p = 0,018$), ebenso die Höhe des Kryptenepithels ($p = 0,038$). Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant verändert gegenüber der Placebogruppe. Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten Veränderungen sowohl beim Vergleich innerhalb der Gruppen als auch zwischen Verum- und Placebogruppe festgestellt. Interessant war in der Placebogruppe jedoch der Trend zu einer Verbesserung des Scores nach 4 Wochen, die jedoch nicht über 8 Wochen anhielt und hier bei den meisten Parametern wieder schlechtere Werte zeigte. Bei der Butyratgruppe ließ sich bei allen Parametern, mit Ausnahme der Lymphfollikel in der Lamina propria, eine Verbesserung über den Untersuchungszeitraum feststellen.

3.4 Beantwortung der Fragen

1. *Hemmt die kurzkettige Fettsäure Butyrat die durch $TNF\alpha$ bzw. $IL-1\beta$ induzierte nukleäre Translokation von $NF-\kappa B$ in HeLa 229-Zellen? Zeigt diese Inhibition eine gewisse Zeit- oder Dosisabhängigkeit?*

In HeLa 229-Zellen war durch eine Vorinkubation mit Butyrat eine wirkungsvolle Inhibition der $TNF\alpha$ -induzierten $NF-\kappa B$ -Translokation zu

erzielen. Dabei ließ sich durch eine Dosis von 4 mM Butyrat bereits nach 24 Stunden eine signifikante Wirkung erreichen, mit 2 mM Butyrat erst nach 36 Stunden, jeweils verglichen mit unbehandelten Zellen. Bei Betrachtung der beiden verwendeten Dosierungen zu den jeweils untersuchten Zeitpunkten, konnte nach 24- und 36stündiger Butyrat-Vorbehandlung ein signifikanter Vorteil der mit 4 mM behandelten Proben gegenüber 2 mM festgestellt werden. Bei einer Behandlung für 48 Stunden waren keine signifikanten Unterschiede zwischen 2 mM und 4 mM Butyrat zu erheben.

Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch für die Hemmung der IL-1 β -induzierten NF- κ B-Translokation nachweisen. Hier war jedoch durch die Vorbehandlung mit 2 mM Butyrat erst nach 48 Stunden eine signifikante Hemmung zu erzielen, bei 4 mM Butyrat war dies bereits nach 36 Stunden der Fall, jeweils verglichen mit unbehandelten Zellen. Bei der Gegenüberstellung von 2 mM und 4 mM Butyrat ließ sich bei einer Inkubationszeit von 36 und 48 Stunden ein signifikanter Vorteil von 4 mM gegenüber 2 mM Butyrat aufzeigen.

Insgesamt betrachtet besteht für die Präinkubation von HeLa 229-Zellen mit Butyrat eine deutliche Zeit- und Dosisabhängigkeit der NF- κ B-Inhibition sowohl nach Stimulation mit TNF α als auch mit IL-1 β .

2. *Lassen sich die Daten bezüglich der NF- κ B-Translokation aus den Versuchen mit HeLa 229-Zellen auf die kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480 und SW620 übertragen?*

Sowohl in SW480- als auch SW620-Zellen ließ sich ein weitgehend den Versuchen mit HeLa 229 entsprechendes Ergebnis erzielen. In beiden Zelllinien war die TNF α - und IL-1 β -induzierte NF- κ B-Translokation

durch eine 24stündige Vorinkubation mit Butyrat sehr wirkungsvoll hemmbar. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden hingegen war nicht in der Lage, eine zusätzliche Verbesserung des Effektes zu erzielen. Weitere Versuche sowie statistische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

3. *Wird die Hemmung der NF- κ B-Translokation durch Butyrat über eine Beeinflussung des inhibitorischen I κ B α -Proteins sowie seiner Phosphorylierung vermittelt?*

Bei der Untersuchung des inhibitorischen Proteins I κ B α sowie seiner phosphorylierten Form Phospho-I κ B α zeigten sich in den Zelllinien HeLa 229, SW480 und SW620 nahezu identische Ergebnisse. Unter der Stimulation mit TNF α kam es zu einem raschen Abfall von I κ B α , welcher durch die 24stündige Präinkubation mit Butyrat verhindert bzw. in seiner Intensität deutlich gemindert wurde. Ein entgegengesetztes Verhalten ließ sich für Phospho-I κ B α nachweisen. Hier kam es nach TNF α -Stimulation zunächst zu einer deutlichen Zunahme des Proteins und später teilweise zu einer leichten Abnahme. Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Butyrat konnte dieser initiale Anstieg verhindert werden, auch kam es im Verlauf zu keiner weiteren Zunahme von Phospho-I κ B α . Zusammenfassend betrachtet wird somit durch eine Butyrat-Vorinkubation nach einem proinflammatorischen Stimulus (hier TNF α) I κ B α im Zytoplasma gehalten und nahezu kein Phospho-I κ B α gebildet. Über diesen Mechanismus bleibt NF- κ B im Zytoplasma an seinen Inhibitor I κ B α gebunden, es kann keine Translokation stattfinden.

Entgegen den Ergebnissen nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation ließ sich durch die Präinkubation von HeLa 229-Zellen mit Butyrat keine effektive Hemmung der $\text{IL-1}\beta$ -induzierten Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ erzielen. Es kam nach 2 Minuten sowohl in den mit Butyrat behandelten als auch den unbehandelten Zellen zu einem raschen Anstieg von Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, dieser war jedoch gefolgt von einem ausgeprägten und schnellen Abfall des Proteins. Bei Betrachtung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zeigte sich nach Stimulation mit $\text{IL-1}\beta$ in unbehandelten Zellen bereits nach 2 Minuten eine deutliche Reduktion und ein Anstieg, fast zurück auf Ausgangswerte, nach 30 Minuten. Diese Zunahme von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach 30 Minuten war bei den mit Butyrat vorbehandelten Zellen nicht bzw. in wesentlich geringerem Ausmaß erkennbar.

4. *Läßt sich durch die lokale Administration von Butyrat bei aktiver distaler Colitis ulcerosa eine Hemmung der NF- κ B-Translokation in Lamina propria-Makrophagen erzielen? Zeigt sich eine Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung?*

Durch die lokale Behandlung der aktiven distalen Colitis ulcerosa mit 100 mM Butyrat in Form von Klistieren läßt sich eine deutliche Inhibition der NF- κ B-Translokation in Lamina propria-Makrophagen erreichen. So zeigte sich innerhalb der Butyrat-Gruppe bereits nach 4 Wochen eine hochsignifikante Reduktion von aktivierten Makrophagen in der Lamina propria, eine Fortführung der Behandlung für weitere 4 Wochen war nicht in der Lage, dieses Ergebnis nochmals zu verbessern. Bei der Gegenüberstellung von Butyrat- und Placebogruppe ließ sich ebenfalls nach 4 Wochen ein hochsignifikanter Vorteil von Butyrat feststellen, der auch nach 8 Wochen noch nachweisbar blieb. Die alleinige Placebo-

Gabe war nicht effektiv, eine Verringerung der Zahl aktivierter Makrophagen herbeizuführen.

5. *Korrelieren die immunhistochemisch gewonnenen Daten zur Butyrat-abhängigen Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in Lamina propria-Makrophagen mit den Erkenntnissen aus Disease Activity Index (DAI), Endoskopie-Score und Histologie-Score?*

Durch die rektale Applikation von 100 mM Butyrat ließ sich im Verlauf der Untersuchung eine signifikante Verringerung der DAI-Werte gegenüber Studienbeginn erreichen. Der Erfolg war bereits nach 4 Wochen signifikant erkennbar, eine leichte weitere Verbesserung bis zur achten Woche dennoch nachweisbar. Im Vergleich mit der Placebo-Gruppe zeigte sich erst nach 8 Wochen ein signifikanter Vorteil der Butyratbehandlung. Die Gabe von Placebo war nicht in der Lage eine deutliche Verbesserung der DAI-Werte herbeizuführen.

Der Endoskopie-Score zeigt, verglichen mit den Ausgangsbefunden, erst nach einer Behandlungszeit von 8 Wochen signifikante Verbesserungen innerhalb der Butyratgruppe. Gegenüber der Placebogruppe sind zwar deutliche Vorteile der Butyratbehandlung bemerkbar, diese sind jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Der histologische Score zeigt zwar tendenziell deutlich verbesserte Parameter innerhalb der Butyratgruppe, die meisten Ergebnisse sind jedoch mit wenigen Ausnahmen nicht signifikant verglichen mit den Ausgangsbefunden und gegenüber der Placebogruppe.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Inhibition der NF- κ B-Translokation in Makrophagen der Lamina propria relativ gut mit dem Disease Activity Index korreliert. Der Endoskopie-Score zeigt erst mit

einer gewissen Latenz eine Verbesserung an, welche jedoch gegenüber Placebo nicht signifikant ist. Die histologischen Parameter verbessern sich entsprechend der Inhibition von NF- κ B ebenfalls im Verlauf, sind aber mit wenigen Ausnahmen nicht signifikant.

4 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen befassen sich mit der antiinflammatorischen Wirkung der kurzkettigen Fettsäure Butyrat. Das Interesse galt dabei insbesondere dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, der neben anderen entzündlichen Erkrankungen auch in der Pathogenese der CED eine bedeutende Rolle spielt. So konnte durch eine Immunfluoreszenzmarkierung der p65-Untereinheit von NF- κ B gezeigt werden, daß sich durch die Vorbehandlung der Adenokarzinomzelllinien HeLa 229, SW480 und SW620 mit Butyrat *in vitro* eine signifikante sowohl zeit- als auch dosisabhängige Hemmung der TNF α - oder IL-1 β -induzierten NF- κ B-Translokation erreichen läßt. Diese geht, zumindest im Fall von TNF α , mit einer eindeutigen Beeinflussung übergeordneter Elemente der NF- κ B-Signaltransduktionskaskade einher, welche sich durch den Nachweis der inhibitorischen Proteine I κ B α und Phospho-I κ B α mittels Western Blot näher verifizieren ließ. Eine Butyrat-Präinkubation der Zellen führte nach der Stimulation mit TNF α in allen untersuchten Zelllinien zu einer Hemmung der Phospho-I κ B α -Bildung. Hierdurch blieb NF- κ B im Zytoplasma an seinen Inhibitor I κ B α gebunden und wurde nicht nukleär transloziert. Im Falle der Stimulation mit IL-1 β zeigten sich keine so eindeutigen Ergebnisse. Dennoch lassen sie Schlüsse auf die mögliche Existenz eines alternativen Signalwegs der NF- κ B-Aktivierung für IL-1 β zu.

Die aus den *in vitro*-Versuchen an o. g. Zelllinien gewonnenen Daten konnten, zumindest teilweise, auch auf die *in vivo*-Situation übertragen werden. Im Rahmen einer placebokontrollierten Studie wurden 11 Patienten mit der Diagnose einer aktiven distalen CU mit der kurzkettigen Fettsäure

Butyrat in Form von Klistieren behandelt. Über den Untersuchungszeitraum von 8 Wochen konnte hierdurch eine signifikante zeitabhängige Inhibition von NF- κ B in LPMNC erzielt werden. Diese Verminderung der NF- κ B-Aktivierung korrelierte dabei relativ gut mit den ermittelten Werten des Disease Activity Index. Der ebenfalls erhobene Endoskopie-Score zeigte erst mit einer gewissen Latenz eine Verbesserung an. Die Befunde des Histologischen Scores haben sich über den Untersuchungszeitraum in der Butyratgruppe für nahezu alle Parameter positiv verändert, nicht jedoch in der Placebogruppe.

4.1 Allgemein

Die CED sind durch eine Rekrutierung zellulärer sowie humoraler Komponenten des Immunsystems in den verschiedenen Bereichen der Darmwand charakterisiert. Für die Pathogenese sowohl der CU als auch des MC wurde dabei in den letzten Jahren insbesondere eine Dysregulation in der Zytokinproduktion sowie in den zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen angenommen [149]. Diesbezüglich konnten mehrere unterschiedliche Tiermodelle einer chronischen intestinalen Entzündung ähnlich den CED etabliert werden, die jeweils Hinweise auf die Natur dieser Dysregulation, sowie auf mögliche zytokinbasierte Behandlungen gaben [15, 149]. Die unkontrollierte Zytokinproduktion resultiert dabei insbesondere aus aktivierten IEC, LPMNC und mukosalen B- und T-Lymphozyten [150]. Dieser Prozess wiederum unterliegt der aktiven Regulation durch NF- κ B, was letzten Endes durch eine vermehrte Sekretion eigener Aktivatoren zur

Unterhaltung der Entzündungsreaktion im Sinne eines positiven autoregulatorischen Feedback-Mechanismus beiträgt [173]. Im speziellen erfolgt ein Eingriff in die transkriptionelle Regulation der Gene für Zytokine und Chemokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 und IL-12 , für die Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie für E-Selectin und die iNOS [63]. Diesen Daten entsprechend konnten die Arbeitsgruppen um Neurath et al. [125, 127] und Rogler et al. [150] einen deutlich erhöhten nukleären Anteil von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in IEC und LPMNC sowohl aus Zellkulturen als auch in Biopsien von Patienten mit MC, CU oder einer unspezifischen Colitis nachweisen. Die Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ scheint dabei jedoch nicht, wie ursprünglich angenommen, spezifisch für den MC zu sein [175], vielmehr spielt sie auch bei der CU eine bedeutende Rolle [83, 127]. Rogler et al. konnten in diesem Zusammenhang via Immunhistochemie eine erhöhte Expression der p65-Untereinheit des $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Heterodimers im Rahmen einer aktiven CED aufzeigen [150].

Die ersten Studien, die eine Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ im Rahmen chronischer intestinaler Entzündungsreaktionen nachweisen konnten, bedienten sich dem Modell einer durch TNBS-induzierten Kolitis in Mäusen [127]. Neurath et al. beschrieben in diesem Zusammenhang eine deutlich erhöhte $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -DNA-Bindungsaktivität in nukleären Extrakten von LPMNC [125, 127]. Die aktivierten $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Heterodimere bestanden dabei aus p65- und p50-Untereinheiten. Nachdem jedoch insbesondere p65 die Transkription proinflammatorischer Gene aktiviert und nicht p50 [134, 171], wurde im Rahmen dieser Untersuchungen der Effekt eines spezifischen p65-Antisense-Oligonukleotids getestet. Es ließ sich eine spezifische und dosisabhängige Verringerung von p65-mRNA sowie p65-Protein beobachten, die von einer ebenfalls deutlich reduzierten Sekretion der Zytokine IL-1 , IL-6

und $\text{TNF}\alpha$ in LPMNC begleitet wurde [128]. Interessanterweise führte bereits die einmalige intravenöse Gabe des p65-Antisense-Oligonukleotids zu einem vollständigen Verschwinden der klinischen Symptome [125, 127]. Durch die lokale intraluminale Gabe konnte ebenfalls eine deutliche Abschwächung der intestinalen Entzündung erzielt werden, hier jedoch mit erheblich geringeren toxischen Effekten gegenüber der intravenösen Gabe [125]. Das therapeutische Potential der p65-Blockade mit Antisense-Oligonukleotiden konnte auch im Vergleich mit der einmaligen oder täglichen Gabe eines Glukokortikoids bei der TNBS-induzierten Kolitis herausgestellt werden [127]. Im Gegensatz hierzu waren Non-Sense-Oligonukleotide in allen Kontrolluntersuchungen nicht effektiv, die Entzündungsreaktion zu verringern [125]. Ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Neurath et al. wurde die Bedeutung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 in IL-10-Knockout-Mäusen als Modell für eine chronische Darmentzündung nachgewiesen [96, 127]. Auch hier zeigte sich eine deutlich überhöhte $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -DNA-Bindungsaktivität und p65-Proteinexpression in LPMNC; die intravenöse bzw. intraluminale Gabe des p65-Antisense-Oligonukleotids führte hier ebenso wie bei der TNBS-induzierten Kolitis zu einer deutlichen Abschwächung der Symptome.

Da $\text{NF-}\kappa\text{B}$ zum einen über zahlreiche Faktoren aktiviert wird [134], zum anderen darüber eine deutliche Verstärkung der Entzündungsantwort bewirkt werden kann, stellt dieser Transkriptionsfaktor einen äußerst interessanten Ansatzpunkt für eine mögliche antiinflammatorische Therapie dar [8]. So gibt es derzeit neben den bereits zuvor beschriebenen Antisense-Oligonukleotiden verschiedene Wege, über die effektiv in die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signaltransduktionskaskade eingegriffen werden kann. Bei Betrachtung der im Rahmen der Standardtherapie der CED eingesetzten Pharmaka zeigt sich

die enorme Bedeutung von NF- κ B und dessen Translokationshemmung, die ebenfalls für die noch im experimentellen Stadium befindlichen Substanzen eine große Rolle zu spielen scheint. So konnte von der Arbeitsgruppe um Kopp et al. herausgestellt werden, daß Azetylsalizylsäure und Natriumsalizylat eine potente Hemmung der NF- κ B-Aktivierung herbeiführen können [92]. Pierce et al. beschreiben in diesem Zusammenhang eine Inhibition der TNF α -induzierten NF- κ B-Aktivierung über eine Hemmung der Phosphorylierung und anschließenden Degradierung von I κ B α durch Salizylate [140]. Ergänzende Daten von Yin et al. konnten dies durch den Nachweis einer spezifischen Hemmung der IKK β durch Azetylsalizylsäure und Natriumsalizylat bestätigen [229]. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Schwenger et al. zufolge ist neben der Inhibition der I κ B α -Phosphorylierung vermutlich auch eine Aktivierung der MAPK (p38) erforderlich [75, 109, 180]. Für die beiden in der CED-Therapie etablierten Substanzen Sulfasalazin und Mesalazin konnte ebenfalls eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz und verschiedenen Wirkmechanismen [88, 215]. Die Arbeitsgruppe um Wahl et al. zeigte eine Interferenz von Sulfasalazin mit der I κ B α -Phosphorylierung und anschließenden Degradierung auf, wodurch eine nukleäre Translokation von aktivem NF- κ B verhindert wird [215]. Weber et al. gelang in diesem Zusammenhang der Nachweis des möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismus: einer direkten Hemmung der IKK α und IKK β durch Sulfasalazin [219]. Demgegenüber scheint Mesalazin seine Wirkung zum einen durch eine Inhibition der induzierbaren Phosphorylierung von RelA/p65 zu entfalten [49], zum anderen durch eher unspezifische Hemmmechanismen im ERK-, JNK- und NF- κ B-Signalweg [88].

Neben den 5-ASA-freisetzenden Präparaten nehmen Glukokortikoide die tragende Position in der Behandlung der CED ein. Sie sind in der Lage, durch die Hemmung der Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Enzymen das Entzündungsgeschehen zu modulieren [11]. Diese Effekte werden durch die Bindung an einen intrazellulären Rezeptor vermittelt, der in den Kern gelangt, dimerisiert und an spezifische DNA-Sequenzen bindet, das sog. Glukokortikoid response element (GRE) [11]. Interessanterweise werden sowohl die antiinflammatorischen als auch die immunsuppressiven Effekte der Glukokortikoide mehr über eine Hemmung als über eine Induktion von Genen vermittelt. Mukaida et al. konnten für diese inhibitorischen Effekte zumindest teilweise eine Suppression der NF- κ B/Rel-Aktivierung nachweisen [122]. Dieser Hemmung liegen nach derzeitigen Erkenntnissen zwei unterschiedliche molekulare Mechanismen zugrunde. Zum einen erfolgt eine *de novo*-Proteinsynthese über eine Induktion der I κ B α -Transkription, interessanterweise wurde aber weder von der Arbeitsgruppe um Auphan et al. noch von der um Scheinman et al. ein GRE im Bereich des Promotors bzw. Enhancers von I κ B α gefunden [5, 163]. Die Wirkung der Glukokortikoide auf die I κ B α -Transkription scheint demnach vielmehr indirekter denn direkter Natur zu sein. Letztlich führt die Vermehrung von I κ B α zu einer Blockade sowohl der NF- κ B-Translokation in den Kern als auch der Bindung an die DNA, wobei dieser Effekt gewebespezifisch ist und nicht universell zu sein scheint [5, 24, 163]. Der zweite Mechanismus der Glukokortikoidwirkung ist gänzlich unabhängig von der Proteinsynthese. Wie Caldenhoven et al. sowie Ray et al. zeigen konnten, erfolgt hier vielmehr eine direkte Interaktion des Liganden-gebundenen Glukokortikoidrezeptors mit der p65-Untereinheit von NF- κ B [27, 144]. Angriffspunkt im speziellen ist die Transaktivierungsdomäne von p65,

wodurch es zu einer Maskierung eines Bereichs für die Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie kommt [42, 171]. Die Bedeutung insbesondere dieses zweiten Mechanismus konnte von der Arbeitsgruppe um Heck et al. bestätigt werden [73]. Die Behandlung mit Glukokortikoiden führt zu einer Unterbrechung des Circulus vitiosus, in dem NF- κ B die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF α oder IL-1 β fördert, die dann wiederum zu einer Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen IEC beitragen.

Das antiinflammatorische Chemokin IL-10 spielt zum einen eine große Rolle in der Pathogenese der CED [100] und zeichnet sich zum anderen durch die Suppression einer großen Anzahl von Zytokinen auf Transkriptionsebene aus [174]. Die Arbeitsgruppen um Wang et al. sowie Romano et al. konnten für IL-10 eine effektive Inhibition von NF- κ B in humanen Monozyten [218] und peripheren T-Lymphozyten [151] nachweisen, was möglicherweise als potentieller Mechanismus der Suppression der Zytokinentranskription angesehen werden kann. In verschiedenen Tiermodellen führte die Behandlung mit IL-10 allein oder in Kombination mit Kortikosteroiden zu einer Hemmung der induzierten chronischen Kolitis [74]. Durch Schreiber et al. wurde in Untersuchungen an Patienten mit einer CED nach Gabe von IL-10 eine deutlich verminderte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α sowie ihrer mRNA in peripheren Monozyten und isolierten LPMNC belegt [176]. Spätere klinische Studien, u. a. durch van Deventer et al., haben für die systemische IL-10-Therapie der CED eine gute Sicherheit, Tolerabilität und Effizienz aufgezeigt [207]. Momentan erscheinen zwei mögliche Mechanismen der IL-10-Wirkung als relativ plausibel. Zum einen inhibiert IL-10 die IKK-Aktivität und verhindert darüber eine TNF α -vermittelte Degradierung von I κ B α , was dann

letztlich zu einer Blockierung der nukleären Translokation von NF- κ B führt [174]. Zum anderen erfolgt durch IL-10 eine direkte Hemmung der NF- κ B-DNA-Bindung, dies interessanterweise jedoch ohne Effekte auf die nukleäre Translokation [31].

Relativ aktuelle Daten weisen darauf hin, daß Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) ebenfalls in Interferenz mit der NF- κ B/Rel-Aktivierung treten [232]. So konnte die Aktivierung von PPAR- γ durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (inkl. Fischöl) und Thiazolidindione wirkungsvoll die TNF α -vermittelte Signaltransduktion unterbinden. PPAR- γ -Liganden schwächen die Expression von Zytokinen in Kolonocyten durch die Inhibition von NF- κ B/Rel via I κ B α -abhängigen Mechanismen [196]. Darüber hinaus vermindern PPAR- γ -Liganden deutlich die intestinale Entzündungsreaktion in Mäusen mit einer Dextranatriumsulfat-induzierten Kolitis [196]. Diese Daten weisen darauf hin, daß PPAR- γ einen weiteren möglichen Angriffspunkt in der Behandlung der CED darstellt. Darüber hinaus konnte für die Aktivierung von PPAR- α von Marx et al. eine Inhibition der TNF α -vermittelten VCAM-1-Genexpression sowie IL-1-vermittelten IL-6-Produktion und COX-2-Expression nachgewiesen werden [111]. Diese Effekte treten ebenfalls als Ergebnis einer Depression der NF- κ B/Rel-Signaltransduktionskaskade auf, die molekularen Mechanismen sind bislang aber noch nicht geklärt.

Trotz der bedeutenden Rolle von NF- κ B p65 im Rahmen der CED bleiben viele Fragen offen. Im speziellen existieren nur relativ wenige Daten zur Bedeutung anderer Mitglieder der NF- κ B/I κ B-Familie in IEC und T-Lymphozyten. Ebenso wurden die Expression und Degradation von I κ B-Proteinen nur schemenhaft charakterisiert. Daten von Jobin et al. zeigen eine Aktivierung von NF- κ B in IEC als Antwort auf eine Stimulation mit

IL-1 β sowie eine behinderte I κ B α -Degradation in nativen Kolonozyten [83]. Solch eine gesteigerte Resistenz von IEC gegenüber der I κ B α -Proteolyse gibt möglicherweise einen Erklärungsansatz für teilweise bessere Reaktionen von Zellen auf therapeutische Blockaden. Tatsächlich gelang Jobin et al. der Nachweis, daß die adenovirusvermittelte Einschleusung einer nichtdegradierbaren I κ B α -Mutante (sog. I κ B α -Superrepressor) in IEC zu einer Blockade der NF- κ B-Aktivierung führt [85], ebenso wie die pharmakologische Suppression der I κ B α -Degradation [83, 170]. Wie die genannte Arbeitsgruppe ebenfalls zeigen konnte, ist durch diese Übertragung eine relativ wirkungsvolle Unterbindung der TNF α - oder IL-1 β -vermittelten Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (speziell der IL-8-Sekretion) möglich [85].

Neben den bereits zuvor beschriebenen Substanzen sind auch weitere in der Lage, eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung herbeizuführen. Hierzu zählen u. a. selektive Proteosomeninhibitoren [84], Cyclosporin A [101], Tacrolimus (FK506) [60] und Thalidomid [90] sowie Rapamycin [99] und Pentoxifyllin [20].

Einen weiteren möglichen und auch potenten Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung stellt die in dieser Arbeit untersuchte KKFS Butyrat dar. Neben den bereits in der Einleitung aufgeführten Effekten auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose von IEC haben KKFS auch ausgeprägte antiinflammatorische Eigenschaften, die bereits in mehreren Studien [22, 23, 137, 165, 168, 184, 191, 192, 209, 210] zur Behandlung der CED nachgewiesen wurden. Die in diesem Zusammenhang ebenfalls mögliche Bedeutung der KKFS in der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen findet Ausdruck in zahlreichen klinischen und experimentellen Daten. So konnte Roediger zeigen, daß KKFS zum einen als Hauptenergieträger der Kolon-

epithelien dienen [146], zum anderen im Rahmen der CU vermindert oxidiert werden [145]. Beruhend auf diesen Ergebnissen führte er die mögliche Ursache entzündlicher Dickdarmerkrankungen auf einen Mangel an KKFS oder aber ein Defizit im KKFS-Metabolismus zurück [148]. Besonders deutlich wird dies bei Betrachtung der Diversions-Kolitis [68, 71] und der Pouchitis [157, 223], beides Erkrankungen, die im Gefolge von operativen Dickdarneingriffen beobachtet werden können: die Diversions-Kolitis insbesondere nach einer Hartmann-OP im Rektum-Stumpf, die Pouchitis nach einer Proktokolektomie und ileoanaler Pouchanlage. Basierend auf der Annahme eines luminalen Mangels an KKFS behandelten Harig et al. erstmalig 1989 die Diversions-Kolitis mittels Instillation von KKFS und konnten hierdurch eine merkliche Besserung der Symptome erzielen [71]. Andere Studien hingegen zeigten keine positiven Effekte im Vergleich mit Placebo [68]. Clausen et al. stellten bei der Pouchitis eine deutlich reduzierte KKFS-Konzentration fest [34], ebenso wie die Arbeitsgruppe um Sagar et al. [157]. Wischmeyer et al. bestätigten diese Befunde, konnten jedoch für die Gabe von Butyrat-Suppositorien keine Besserung der Symptome feststellen [223]. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Daten aus o. g. Studien bezüglich der Behandlung der Diversions-Kolitis und Pouchitis mit KKFS als kontrovers anzusehen bleiben. Anders stellt es sich bei der Strahlenproktitis dar. Zwar ist auch hier die Datenlage nicht besonders umfangreich, dennoch erzielten Al-Sabbagh et al. [3] und Vernia et al. [211] eine signifikante Besserung der Symptome durch eine Therapie mit KKFS bzw. Butyrat. Weitere Untersuchungen erscheinen hier sinnvoll. Das von Roediger propagierte Konzept der „nutritional colitis“ [145, 146], welches auf die Diversions-Kolitis und Pouchitis angewendet wurde, fand auch große Beachtung bezüglich der Pathogenese der CU. So wurden von Chapman et al. [28, 29] die vorgenannten Daten von Roediger [145, 146]

bestätigt, nicht jedoch von der Arbeitsgruppe um Finnie et al. [57], die zwar einen gesteigerten Glutamin-, jedoch keinen Defekt im Butyrat-Metabolismus aufzeigen konnte. Beruhend auf der Annahme eines (partiellen) Defektes des mukosalen KKFS-Metabolismus wurden mehrere unkontrollierte (Tab. 4) [22, 137, 191, 209] und kontrollierte Studien (Tab. 5) [23, 165, 168, 184, 192, 210] zur klinischen Anwendung von KKFS durchgeführt.

Tab. 4: Effekte der topischen Anwendung von KKFS in der Therapie der aktiven distalen Colitis ulcerosa: *unkontrollierte Studien* (modifiziert nach Kim [91]).

Autor (Jahr)	n	Schweregrad (Dauer)	Dosis und Frequenz (Dauer)	Begleitmedikation***	Ergebnis****
Breuer (1991) [22]	12	refraktär* (> 3 Monate)	KKFS** 2 x pro Tag (6 Wochen)	Sulfasalazin und/oder Kortison	KB: 9/12 KA: ↓ Histo: ↑
Steinhart (1994) [191]	10	refraktär* (> 2 Monate)	80 mM Butyrat 1 x pro Tag (6 Wochen)	5-ASA und/oder Kortison	KB: 6/10 KA: ↓ KR: 4/10
Vernia (1995) [209]	9	refraktär* (> 6 Wochen)	80 mM Butyrat + 5-ASA 2 g 2 x pro Tag (4 Wochen)	5-ASA	KB: 7/9 KA: ↓ Endo: ↑ Histo: ↑
Patz (1996) [137]	10	refraktär* (> 15,8 Monate)	KKFS** 2 x pro Tag (6 Wochen)	5-ASA und/oder Kortison	KB: 5/10 Endo: ↑ Histo: –

* keine Reaktion auf die Therapie mit 5-ASA, Sulfasalazin, Kortison p. o. oder rektal

** KKFS = Gemisch aus unterschiedlichen Anteilen Acetat, Propionat und Butyrat

*** Gabe jeweils p. o.

**** Klinische Besserung (KB), Klinische Remission (KR), Krankheitsaktivität (KA), Endoskopie-Score (Endo), Histologie-Score (Histo), gebessert (↑), verringert (↓), keine Änderung (–)

Untersucht worden sind dabei in den meisten Fällen die rektale Gabe von KKFS-Gemischen mit unterschiedlichen Anteilen von Acetat (60 – 80 mM), Propionat (30 mM) und Butyrat (40 mM) sowie von Butyrat (40, 80 und 100 mM) allein und in Kombination mit 5-ASA (2 g). In den kon-

Tab. 5: Effekte der topischen Anwendung von KKFS in der Therapie der aktiven distalen Colitis ulcerosa: *kontrollierte Studien* (randomisiert, doppelblind, placebokontrolliert) (ergänzt und modifiziert nach Kim [91]).

Autor (Jahr)	n	Schweregrad (Dauer)	Dosis und Frequenz (Dauer)	Begleitmedikation***	Ergebnis****
Scheppach (1992) [168]	10	refraktär* (> 2 Monate)	40 mM Butyrat vs. Placebo 2 x pro Tag (2 Wochen)	Sulfasalazin und/oder Kortison p. o.	KB: 9/10 Endo: ↑ Histo: ↑
Senagore (1992) [184]	45	milde bis moderate Proktosigmoiditis (unbekannt)	KKFS** (2 x pro Tag vs. Kortison rektal 1 x pro Tag vs. 5-ASA rektal 1 x pro Tag (6 Wochen)	–	KB; Endo, Histo: ↑; in allen 3 Gruppen; jedoch ohne signifikante Unter- schiede
Vernia (1995) [210]	45	mild bis moderat (> 2 Monate)	KKFS** vs. Placebo 2 x pro Tag (6 Wochen)	5-ASA oder Sulfasalazin p. o.	KB: 14/20 (KKFS), 5/20 (Plc) KA: ↓ (KKFS), – (Plc) Endo, Histo: – (KKFS), – (Plc)
Steinhart (1996) [192]	38	mild bis moderat (> 7,5 Monate)	80 mM Butyrat vs. Placebo 1 x pro Tag (8 Wochen)	5-ASA, Sulfasalazin und/oder Kortison p. o.	Keine signifikanten Unterschiede bezüglich KA, Endo und Histo
Scheppach (1996) [165]	47	mild bis moderat (> 30 Monate)	KKFS** vs. Placebo 100 mM Butyrat 2 x pro Tag (8 Wochen)	5-ASA, Sulfasalazin und/oder Kortison p. o.	KA: ↓ in allen 3 Gruppen Endo, Histo: ↓ in allen 3 Gruppen
Breuer (1997) [23]	103	(> 30 Monate)	KKFS** vs. Placebo 2 x pro Tag (6 Wochen)	5-ASA und/oder Kortison p. o.	KB: 18/45 (KKFS), 15/46 (Plc) KA: ↓ (signifikant)

* keine Reaktion auf die Therapie mit 5-ASA, Sulfasalazin, Kortison p. o. oder rektal

** KKFS = Gemisch aus unterschiedlichen Anteilen Acetat, Propionat und Butyrat

*** Gabe jeweils p. o.

**** Klinische Besserung (KB), Krankheitsaktivität (KA), Endoskopie-Score (Endo), Histologie-Score (Histo), gebessert (↑), verringert (↓), keine Änderung (–); Plc = Placebo

trollierten Studien (*Tab. 5*) wurden entsprechende Vergleiche gezogen mit einer Placebobehandlung (isotone Kochsalzlösung), der rektalen Gabe von Kortikosteroiden (100 mg Hydrocortison) bzw. 5-ASA (4 g).

Die Ergebnisse der Studien weisen KKFS, speziell jedoch Butyrat, als interessante Substanzen zur effektiven Besserung der Symptome und Entzündungsaktivität bei einer CU aus. Darüber hinaus wurden mehrere potentielle Mechanismen vorgestellt, wie KKFS eine Remission sowohl im klinischen, endoskopischen und auch histologischen Sinne herbeiführen könnten [41, 94, 98, 120], der exakte Weg ist jedoch unklar. Spekuliert wurde in diesem Zusammenhang über (1) ein höheres Energieangebot für die Kolonozyten [145], (2) die Stimulation der Zellproliferation [94], (3) die Aufrechterhaltung einer intakten Epithelzellbarriere sowie deren Reparatur [41, 214], (4) eine Dilatation der Kolonarterien mit Erhöhung des mukosalen Blutflusses [120] und (5) eine erleichterte NaCl- und Wasser-Resorption [19].

Als relativ aktuellen und interessanten Ansatz konnten Inan et al. für die Inkubation von Kolonkarzinomzellen mit Butyrat eine effektive Hemmung der konstitutiven sowie TNF α -vermittelten NF- κ B-Translokation in HT-29-Zellen nachweisen [81]. Bereits einige Jahre zuvor war es Gibson et al. gelungen, eine erhöhte IL-8-Sekretion im Rahmen der CED sowie deren Hemmung durch die KKFS Butyrat nachzuweisen. Da IL-8 auch zu den transkriptionell über NF- κ B regulierten Zytokinen gehört, erscheint eine Beeinflussung dieses Signalweges wahrscheinlich [65]. Yin et al. gelang ein vermutlich großer Schritt in Richtung der Aufklärung des Wirkmechanismus von Butyrat. Diese Arbeitsgruppe konnte zum einen eine Inhibition der TNF α -induzierten NF- κ B-Aktivierung nachweisen, zum anderen eine Suppression der Proteosomenaktivität durch Butyrat [228]. Diese wird möglicherweise durch eine Hemmung der Histondeacetylase vermittelt, da

sich durch den spezifischen Deacetylaseinhibitor Trichostatin A identische Effekte erzielen lassen [61, 228].

Was letztlich die klinische Anwendung und Bedeutung von Butyrat angeht, so verglichen Vernia et al. in einer aktuellen randomisierten und placebo-kontrollierten Doppelblindstudie erstmals die Behandlung der CU durch die oral verabreichte Kombination aus Butyrat und Mesalazin mit der Behandlung durch Mesalazin allein [212]. Die Verbesserungen innerhalb der Kombinationstherapie-Gruppe waren über den Untersuchungszeitraum von 6 Wochen alle signifikant, nicht jedoch im Vergleich mit der Mesalazin-Gruppe. Kanauchi et al. gingen noch einen Schritt weiter [89]. Hier wurden ausschließlich gerstenhaltige Nahrungsmittel verabreicht. Diese führen erst über die bakterielle Fermentation der komplexen Kohlenhydrate durch die anaerobe Dickdarmflora zu einem signifikanten Anstieg der Butyrat-Konzentration. In der Kolonschleimhaut ließ sich eine Reduktion der mukosalen Hyperplasie ebenso nachweisen wie eine Hemmung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B und der Produktion von IL-8 [89].

4.2 Hemmung der TNF α vermittelten NF- κ B-Translokation

Durch mehrere *in vivo*-Untersuchungen konnte die enorme Bedeutung von NF- κ B in der Pathogenese der CED aufgezeigt werden [127, 173]. Rogler et al. wiesen eine Aktivierung von NF- κ B insbesondere in LPMNC und IEC betroffener Schleimhaut nach, nicht jedoch in benachbarten Arealen gesunder Mukosa [150]. Die Arbeitsgruppe um Neurath et al. zeigte in diesem Zusammenhang in Mäusen mit einer TNBS-induzierten Kolitis eine enorm

gesteigerte Produktion von Zytokinen (IL-1 β , IL-6 und TNF α) durch LPMNC auf [127]. Diese Zytokine werden allesamt positiv durch NF- κ B reguliert. Eine Dysregulation in der Zytokinproduktion sowie in den zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen wurde von Rogler et al. als möglicher pathogenetischer Faktor der CED angenommen [149]. Die Arbeitsgruppe um Segain et al. konnte diesbezüglich beim MC eine deutlich reduzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine durch eine Behandlung mit Butyrat nachweisen [181]. Diese war vergesellschaftet mit einer Inhibition der NF- κ B-Aktivierung sowie I κ B α -Degradierung.

In dieser Arbeit wurde durch Immunfluoreszenzmarkierungen von NF- κ B p65 gezeigt, daß sich durch eine Butyrat-Vorbehandlung der Adenokarzinomzelllinien HeLa 229, SW480 und SW620 eine signifikante sowohl zeit- als auch dosisabhängige Hemmung der TNF α -induzierten Translokation von NF- κ B erreichen läßt. Parallel hierzu ließ sich durch den Nachweis der inhibitorischen Proteine I κ B α und Phospho-I κ B α mittels Western Blot aufzeigen, daß eine Butyrat-Präinkubation in allen untersuchten Zelllinien zu einer Hemmung der Phospho-I κ B α -Bildung (nach Stimulation mit TNF α) führte. Hierdurch blieb NF- κ B im Zytoplasma an seinen Inhibitor I κ B α gebunden und wurde nach Stimulation nicht nukleär transloziert. In Übereinstimmung mit diesen Daten haben Inan et al. nachgewiesen, daß eine Präinkubation der humanen Adenokarzinomzelllinie HT-29 mit Butyrat sowohl zu einer effektiven Hemmung der konstitutiven als auch der TNF α -vermittelten NF- κ B-Translokation führt [81]. Interessanterweise hatte dabei die Stimulation mit TNF α keine signifikanten Auswirkungen auf das Niveau des inhibitorischen I κ B α -Proteins. Möglicherweise scheint daher in HT-29-Zellen die NF- κ B-Aktivierung unabhängig von einer I κ B α -Phosphorylierung und -Degradierung zu erfolgen [81]. Demgegenüber wird

in den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien HeLa 229, SW480 und SW620 die TNF α -vermittelte Translokation von NF- κ B eindeutig über eine Beeinflussung der I κ B α -Phosphorylierung erreicht. Nach Stimulation mit TNF α verschwindet die Bande von I κ B α und eine Zunahme von Phospho-I κ B α ist zu verzeichnen. Werden die Zellen mit Butyrat vorbehandelt, bleibt die I κ B α -Bande nahezu erhalten und eine Phospho-I κ B α -Bildung wird wirkungsvoll verhindert. Letztlich unklar bleibt jedoch der genaue Mechanismus, wie Butyrat eine Inhibition der I κ B α -Phosphorylierung bewirkt. Wahl et al. konnten in diesem Zusammenhang in der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie SW620 eine Hemmung der TNF α -induzierten I κ B α -Phosphorylierung durch Sulfasalazin nachweisen [215]. Ergänzt wurden diese Ergebnisse von Weber et al., der zeigen konnte daß Sulfasalazin als direkter Inhibitor von IKK α und IKK β durch Verhinderung der ATP-Bindung fungiert [219]. Dementsprechend war die Wirkung von Sulfasalazin durch ein Überangebot von ATP antagonisierbar [219]. Yan et al. wiesen in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Hemmung der IKK α -vermittelten I κ B α -Phosphorylierung nach, allerdings durch Verwendung der Reinsubstanz 5-Aminosalizylsäure [226]. Was letztlich die Wirkung von Butyrat angeht, so haben Yin et al. kürzlich maßgebliche Daten präsentiert [228]. Zum einen zeigten sie, daß eine Butyrat-Vorbehandlung von HT-29-Zellen zu einer Hemmung der NF- κ B-Aktivierung nach TNF α -Behandlung führt, basierend auf einer Erhöhung von p100 und I κ B α . Zum anderen läßt sich durch Butyrat eine Suppression der Proteosomenaktivität und dementsprechend auch eine Hemmung der I κ B α -Degradierung erzielen [228]. Diese Wirkung könnte durch die Inhibition der Histondeacetylase vermittelt sein, nachdem der Einsatz des spezifischen Deacetylaseinhibitors Trichostatin A in identischen Effekten mündet [61, 228]. Conner et al.

zeigten ebenfalls in diesem Zusammenhang für den Einstz von Proteosomeninhibitoren eine Hemmung der NO-Synthase, VCAM-1-Transkription sowie Kolitisentwicklung [35].

Einen weiteren interessanten Aspekt der Butyrat-Wirkung stellt dessen Einfluß auf die Apoptose dar. So konnten Lührs et al. in SW620-Zellen eine deutlich gesteigerte Apoptoserate nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation und gleichzeitiger Inkubation mit Butyrat nachweisen [104]. Dieser additive Effekt wurde zumindest teilweise einer Hemmung der nukleären Translokation von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ zugeschrieben. Diese Befunde konnten von Feinman et al. ebenfalls für die Zelllinie HT-29 nachgewiesen werden, spekuliert wurde hier über die mögliche potentielle therapeutische Rolle von Butyrat in der Therapie des Kolonkarzinoms [56]. Interessant erscheint dabei insbesondere die Möglichkeit der nach heutigen Erkenntnissen relativ selektiven Induktion von Apoptose bei gleichzeitiger Hemmung der vielfach begleitenden Entzündungsreaktion, auch z. B. im Rahmen einer Chemotherapie [216].

Eine große Anzahl extrazellulärer Stimuli, inkl. $\text{TNF}\alpha$, führen zu einer Phosphorylierung und Degradierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mit anschließender nukleärer Translokation und DNA-Bindung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [134]. Einige dieser Stimuli bewirken neben einer Aktivierung der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signaltransduktionkaskade auch eine direkte Phosphorylierung der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ RelA (p65)-Untereinheit, wodurch die Transaktivierungskapazität positiv reguliert wird [159, 188, 217]. Hieraus ergibt sich die Annahme, daß die direkte Phosphorylierung von p65, neben der zytoplasmatischen Komplexbildung mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, möglicherweise einen weiteren Kontrollmechanismus der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung repräsentiert. Der exakte Mechanismus der Butyrat-Wirkung ist, wie bereits oben erwähnt, Bestandteil weiterer aktiver Forschung. So kann die Inhibition der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Phosphorylierung durch Butyrat

zum einen über direkte Hemmung der $IKK\alpha$ und $IKK\beta$ [219, 226], zum anderen über Beeinflussung übergeordneter Faktoren wie z. B. der p38 MAPK vermittelt sein [75, 180]. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang insbesondere der Ansatz von Yin et al., der eine Hemmung der Proteosomenaktivität und dementsprechend auch eine Inhibition der $I\kappa B\alpha$ -Degradierung durch Butyrat nachweisen konnte [228].

4.3 Inhibition der IL-1 β -vermittelten NF- κ B-Translokation

Durch die Darstellung von NF- κ B (p65) mittels Immunfluoreszenzfärbung ließ sich im Rahmen dieser Arbeit in HeLa 229-Zellen eine sowohl zeit- als auch dosisabhängige Inhibition der IL-1 β -induzierten nukleären Translokation von NF- κ B durch Butyrat aufzeigen. Was die Bedeutung in der Pathogenese der CED angeht, so konnten Neurath et al. neben $TNF\alpha$ und IL-6 auch für das proinflammatorische Zytokin IL-1 β eine deutlich gesteigerte Expression im Rahmen der TNBS-induzierten Kolitis in Mäusen feststellen [127]. Genau wie $TNF\alpha$ und IL-6 wird auch IL-1 β über NF- κ B reguliert. Daher erscheint ein Eingriff in diesen Signaltransduktionsweg zur Durchbrechung einer den CED möglicherweise zugrundeliegenden Dysregulation in der Zytokinproduktion äußerst interessant [149]. Segain et al. haben beim MC eine Inhibition der NF- κ B-Aktivierung sowie $I\kappa B\alpha$ -Degradierung durch eine Behandlung mit Butyrat nachgewiesen, ebenso wie eine deutliche Reduktion proinflammatorischer Zytokine [181]. Nachdem für Salizylate die Hemmung der NF- κ B-Translokation über eine Inhibition der $I\kappa B\alpha$ -

Phosphorylierung gezeigt werden konnte [140, 215, 219, 226], wurde in dieser Arbeit ebenfalls das inhibitorische $I\kappa B\alpha$ -Protein sowie seine Beeinflussung durch Butyrat untersucht. Interessanterweise zeigten sich dabei für die mit Butyrat behandelten und die unbehandelten HeLa 229-Zellen reproduzierbar gleiche Ergebnisse mit einer deutlichen Zunahme von Phospho- $I\kappa B\alpha$ nach 2 Minuten. Eine längere Stimulation mit $IL-1\beta$ führte zu keinem weiteren Anstieg, vielmehr kam es zu einem ausgeprägten Abfall von Phospho- $I\kappa B\alpha$. Da $NF-\kappa B$ in der Lage ist, nach der transienten Regulation von Zielgenen, seine eigene Aktivität zu beeinflussen, könnte sich hieraus ein Hinweis auf einen intakten negativen Rückkopplungsmechanismus ergeben [43]. Bei der Untersuchung von $I\kappa B\alpha$ zeigte sich nach Stimulation mit $IL-1\beta$ in unbehandelten Zellen bereits nach 2 Minuten eine deutliche Reduktion von $I\kappa B\alpha$ und ein Anstieg, fast zurück auf die Ausgangswerte, nach 30 Minuten. Diese Zunahme von $I\kappa B\alpha$ nach 30 Minuten war bei den mit Butyrat vorbehandelten Zellen nicht bzw. in wesentlich geringerem Ausmaß erkennbar. Dies könnte ein Hinweis auf einen „Defekt“ im Feedbackmechanismus sein, der möglicherweise auf eine effektive Blockade der nukleären Translokation von $NF-\kappa B$ zurückzuführen sein könnte [43].

Im Gegensatz zu eigenen Ergebnissen haben Inan et al. in HT-29-Zellen keine effektive Hemmung der $IL-1\beta$ -induzierten $NF-\kappa B$ -Aktivierung festgestellt, sie fanden nach Butyrat-Präinkubation vielmehr eine gesteigerte Aktivität [81]. In HeLa 229-Zellen führt eine Vorbehandlung mit Butyrat zu einer Inhibition der $IL-1\beta$ -vermittelten $NF-\kappa B$ -Translokation, die aber nicht über eine Suppression der $I\kappa B\alpha$ -Phosphorylierung bzw. -Degradierung vermittelt zu sein scheint. Jobin et al. beschreiben in diesem Zusammenhang zwar eine $IL-1\beta$ -induzierte $NF-\kappa B$ -Aktivierung und Expression

NF- κ B-abhängiger Gene, weisen aber auch auf eine wahrscheinlich zelllinienabhängige gestörte Regulation der I κ B α -Degradierung hin [83]. Egan et al. konnten zeigen, daß Mesalazin in der kolorektale Adenokarzinomzelllinie Caco-2 wirkungsvoll die IL-1 β -induzierte NF- κ B-abhängige Transkription inhibiert, ohne jedoch die I κ B α -Phosphorylierung, DNA-Bindung oder nukleäre Translokation von NF- κ B zu beeinflussen [49]. Darüber hinaus stellte diese Arbeitsgruppe fest, daß die induzierbare Phosphorylierung von RelA zum einen eine große Bedeutung in der Kontrolle der NF- κ B-Aktivität hat, zum anderen einen potenten I κ B α -unabhängigen Mechanismus der NF- κ B-Aktivierung darstellt. Parallel zur Hemmung der transkriptionellen NF- κ B-Aktivität durch Mesalazin ist eine dementsprechende Inhibition der IL-1 β -induzierten RelA-Phosphorylierung beobachtet worden [49]. Wilson et al. demonstrierten einen möglichen neuen Weg der NF- κ B-Aktivierung über die Proteinkinase C (PKC), der unabhängig von I κ B α -Phosphorylierung oder -Degradierung abzulaufen scheint [222]. Interessanterweise haben die Autoren in den humanen Kolonkarzinomzellen DLD-1 für die IL-1 β -induzierte NF- κ B-Aktivierung dennoch eine Verringerung der I κ B α -Proteinmenge nachgewiesen. Diese war durch einen Proteosomeninhibitor hemmbar [222].

Die eigenen Daten zeigen eindeutig, daß eine Butyratpräinkubation in HeLa 229-Zellen zu einer effektiven Hemmung der IL-1 β -induzierten NF- κ B-Translokation führt. Eine Inhibition der I κ B α -Phosphorylierung bzw. -Degradierung ist dabei jedoch nicht nachweisbar, wobei nicht auszuschließen ist, ob nicht ein anderes der inhibitorischen I κ B-Proteine diese Aufgabe übernehmen könnte. Bislang bestand eine eindeutige Meinung darüber, daß eine Phosphorylierung und Degradierung von I κ B α zu einer nukleären Translokation von NF- κ B führt. Wahrscheinlicher erscheint

jedoch, insbesondere auch vor dem Hintergrund der eigenen Ergebnisse und den Erkenntnissen von Jobin et al. [83], die Existenz zelllinienspezifischer $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -abhängiger und unabhängiger $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierungswege. Interessant sind dabei auch Daten von Chen et al., die erst kürzlich die teilweise Bedeutung der Acetylierung von RelA für die nukleäre Funktion von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aufzeigen konnten [30].

4.4 Hemmung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in Lamina propria-Makrophagen

Die generelle Bedeutung der ortsständigen Makrophagen der Lamina propria im Rahmen der Immunpathogenese der CED wurde von der Arbeitsgruppe um Mahida et al. aufgezeigt [108]. Rogler et al. konnten in diesem Zusammenhang eine Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in LPMNC und IEC aus Arealen betroffener Mukosa nachweisen, nicht jedoch in benachbarter gesunder Schleimhaut [150]. Neben der Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ scheint auch die gesteigerte Produktion der von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ positiv regulierten Zytokine durch LPMNC eine wichtige Rolle in der Initiation der mukosalen Entzündungsreaktion sowie deren Unterhaltung zu spielen [97, 127, 149, 195]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde von Bantel et al. festgestellt, daß eine Behandlung der CU mit Mesalazin zu einer Suppression der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Translokation in einer signifikanten Anzahl von LPMNC führt [10]. Haskó et al. konnten ebenfalls eine Hemmung der Makrophagenaktivierung aufzeigen, allerdings durch Sulfasalazin, einem ebenfalls bekannten potenten Inhibitor der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Translokation [72]. Segain et al. wiesen in diesem Zusammenhang nach, daß sich auch beim MC eine Hemmung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$

durch eine Behandlung mit Butyrat erreichen läßt, ebenso wie eine deutlich reduzierte Produktion der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, IL-6 und IL- 1β [181]. Ergänzt wurden diese Erkenntnisse von Saemann et al., die zeigen konnten, daß Butyrat die bakteriell-induzierte Sekretion des ebenfalls proinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-12 in isolierten peripheren Blut-Monozyten inhibiert [156].

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte erstmals für die topische Anwendung von Butyrat bei Patienten mit einer distalen CU eine zeitabhängige Inhibition der NF- κ B-Translokation in LPMNC nachgewiesen werden. Durch die insgesamt 8wöchige topische Therapie mit Butyrat ließ sich sowohl innerhalb der Verumgruppe als auch im Vergleich mit der Placebobehandlung eine hochsignifikante Reduktion der Anzahl aktivierter LPMNC erzielen. Diese Befunde korrelieren mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppen von Bantel et al. [10] und Segain et al. [181] bezüglich der Bedeutung einer NF- κ B-Aktivierung in LPMNC für die Pathogenese sowie deren Hemmung für die Therapie der CED. Ähnlich der NF- κ B-Inhibition durch Butyrat in unterschiedlichen Adenokarzinomzellen *in vitro* führt auch die topische *in vivo*-Anwendung bei CU-Patienten zu einer potenten und effektiven Suppression der NF- κ B-Translokation.

Um die Erkenntnisse zur Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in LPMNC mit Entzündungszeichen und klinischem Bild der CU in Verbindung zu bringen, wurden makroskopische und mikroskopische Veränderungen untersucht sowie die Krankheitsaktivität mittels DAI erhoben. Nahezu alle histologischen Befunde zeigten während der 8wöchigen Butyrat-Behandlung einen deutlichen Trend in Richtung einer Reduktion der mukosalen Entzündungsreaktion, wobei nur wenige Parameter das Signifikanzniveau erreichten. In mehreren Studien wurden diese Befunde bestätigt und daneben auch signi-

fikante Verbesserungen durch die topische Therapie mit KKFS aufgezeigt [22, 23, 168, 209]. Im Gegensatz hierzu konnten andere Untersuchungen nur marginale Effekte von Butyrat auf die histologischen Veränderungen nachweisen [210]. Die Auswertung der endoskopisch erhobenen Daten ergab eine signifikante Reduktion des Endoskopiescores innerhalb der Butyratgruppe, nicht jedoch im Vergleich mit der Placebobehandlung. Eindeutigere Ergebnisse brachte hier der DAI hervor: sowohl innerhalb der Butyratgruppe als auch gegenüber der Placebobehandlung konnten über den Untersuchungszeitraum von 8 Wochen signifikante Verbesserungen erzielt werden. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen die die Arbeitsgruppen um Scheppach et al. [168] und Vernia et al. [210] erzielt haben. Ähnliche Effekte wurden auch für die Behandlung der akuten Strahlenproktitis mit Butyrat beschrieben [211].

Was die antiinflammatorische Wirkung von Butyrat bei der CU bzw. den CED angeht, so wurde diese zunächst mit der Wiederherstellung eines normalen Energiehaushaltes der Kolonepithelien begründet, Roediger prägte in diesem Zusammenhang den Begriff der „nutritional colitis“ [145]. Die Mangelzustände konnten jedoch in neueren Studien nicht bestätigt werden [44]. Vielmehr wurden von mehreren Arbeitsgruppen für Butyrat teilweise ausgeprägte immunmodulatorische Effekte demonstriert: Verringerung der T-Zell-Antwort [67], Auslösung einer Th1-Anergie [186], Modulation von mit der Antigenpräsentation assoziierten Molekülen [21]. Aktuelle Untersuchungen hingegen beziehen sich zunehmend auf die Inhibition von NF- κ B bzw. die Beeinflussung der NF- κ B-Signaltransduktionskaskade durch Butyrat [81, 181], wobei bislang nicht geklärt ist, ob dadurch nicht auch die o. g. Effekte ausgelöst werden können. Interessante Ansätze stellen dabei die Ergebnisse von Yin et al. [228] sowie Chen et al. [30] dar, die neben dem „klassischen“ Aktivierungsweg für NF- κ B einige Alternativen

aufzeigen konnten: Hemmung der Proteosomenaktivität und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Degradierung durch Butyrat [228], Beeinflussung der nukleären Funktion von NF- κB durch direkte Acetylierung von RelA [30].

4.5 *Schlußfolgerung und Ausblick*

Zunächst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß eine Behandlung mit der KKFS Butyrat *in vitro* zu einer zeit- und dosisabhängigen Inhibition der TNF α - bzw. IL-1 β -induzierten NF- κB -Translokation in den Adenokarzinomzelllinien HeLa 229, SW480 und SW620 führt. Ergänzende Untersuchungen der inhibitorischen Proteine $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ erbrachten folgende Erkenntnisse: in HeLa 229-, SW480- und SW620-Zellen führte die Stimulation mit TNF α zu einer raschen Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und dementsprechend einer Abnahme von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und Zunahme von Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Diese Reaktion war durch eine Vorinkubation der Zellen mit Butyrat hemmbar; nach TNF α -Stimulation kam es zu keiner oder aber nur wenig ausgeprägten Verringerung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, ebenso war kein Anstieg von Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu verzeichnen. Bei der Stimulation von HeLa 229-Zellen mit IL-1 β sind diese Ergebnisse nicht erzielt worden. Vielmehr fanden sich Hinweise auf eine Unterbrechung des negativen Feedbackmechanismus, der möglicherweise auf eine effektive Blockade der nukleären Translokation von NF- κB durch Butyrat zurückzuführen sein könnte [43]. Die unterschiedlichen Ergebnisse aus den Versuchen mit TNF α und IL-1 β ergaben Hinweise auf verschiedene Wege der NF- κB -Aktivierung. Diese erscheinen

insbesondere auch vor dem Hintergrund der Erkenntnisse von Inan et al. [81] sowie Wilson et al. [222] interessant.

Durch weiterführende Untersuchungen an Biopsien von Patienten mit einer distalen CU konnte eine effektive zeit- und dosisabhängige Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in LPMNC durch die topische Therapie mit Butyrat *in vivo* aufgezeigt werden. Diese Inhibition der NF- κ B-Translokation ging einher mit einer Verbesserung des DAI, des Endoskopie-Scores sowie der meisten histologischen Parameter im Verlauf der Behandlung. Aufgrund der relativ eindeutigen Ergebnisse aber nur geringen Fallzahl sollten weitere klinische Studien zur Anwendung von Butyrat in der Behandlung der CU durchgeführt werden. Aktuelle Ansätze konnten diesbezüglich Vernia et al. (orale Anwendung von Butyrat) [212] sowie Kanauchi et al. (Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch gerstenhaltige Nahrungsmittel) [89] präsentieren. Insgesamt stellt die Anwendung der KKFS Butyrat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine kostengünstige und zugleich potente Möglichkeit der Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B dar. So konnten in dieser Arbeit für Butyrat die Daten mehrerer Untersuchungen zur Wirkung von Mesalazin [10, 212], Sulfasalazin [72, 215, 219] und Salizylaten [140, 229] auf die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade bestätigt werden. Dennoch bleibt trotz mehrerer verschiedener Ansätze, wie Butyrat möglicherweise diese Hemmung auslöst und seine antiinflammatorische Wirkung entfaltet, der exakte Mechanismus weiterhin unklar und Gegenstand aktueller Forschung. Interessant erscheinen dabei insbesondere Daten von Yin et al. über die Suppression der Proteosomenaktivität [228] und Fusunyan et al. zur Acetylierung von Histonproteinen [61] durch Butyrat sowie von Chen et al. über eine direkte Acetylierung von RelA [30]. Da sich sowohl aus dieser Arbeit als auch aus Daten anderer Arbeitsgruppen [81, 83, 217, 222, 228] Hinwei-

se auf deutliche interzelluläre Unterschiede im Reaktionsmuster auf verschiedene Stimuli (z. B. Zytokine) ergeben, erscheint die Übertragbarkeit von Ergebnissen relativ problematisch und sollte Berücksichtigung in deren Interpretation finden.

Inwieweit die in den letzten Jahren entdeckten Toll-like receptors (TLR) neben ihrer Bedeutung für die angeborene Immunität eine Rolle in der Pathogenese der CED haben, ist Gegenstand aktueller Forschung [233]. Faure et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß eine durch bakterielle LPS vermittelte NF- κ B-Aktivierung über den TLR 4 vermittelt wird [54]. Weitere Untersuchungen, insbesondere ob durch Butyrat auch in diesen Mechanismus eingegriffen werden kann, erscheinen daher sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Die kurzkettige Fettsäure Butyrat entsteht durch anaerobe bakterielle Fermentation nichtspaltbarer Kohlenhydrate (sog. resistente Stärke) im Dickdarm des Menschen und dient den Kolonepithelien als Hauptenergieträger. In mehreren klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß die lokale Therapie der Colitis ulcerosa mit Butyrat zu einer deutlichen Abnahme der Entzündungsaktivität führt.

Im Verlauf nahezu sämtlicher entzündlicher Prozesse ist NF- κ B maßgeblich an der transkriptionellen Regulation proinflammatorisch wirkender Genprodukte beteiligt. Durch Entzündungsmediatoren wie z. B. TNF α oder IL-1 β kommt es zur nukleären Translokation des aktiven NF- κ B, der normalerweise im Zytoplasma gebunden an inhibitorische I κ B-Proteine vorliegt. Im Rahmen der Colitis ulcerosa ist NF- κ B u. a. in Lamina propria-Makrophagen und intestinalen Epithelzellen aktiviert.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, zum einen in Zellkulturversuchen an mehreren Adenokarzinomzelllinien, zum anderen an Biopsien von Patienten mit einer distalen Colitis ulcerosa aufzuzeigen, inwieweit die kurzkettige Fettsäure Butyrat die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B inhibiert und welcher Mechanismus dieser Hemmung möglicherweise zugrunde liegt.

Im einzelnen wurden im Rahmen dieser Arbeit die folgenden Ergebnisse erzielt:

Nach einer Stimulation der Zelllinie HeLa 229 mit TNF α oder IL-1 β kommt es in nahezu 90 % aller Zellen zu einer Translokation von NF- κ B in

den Zellkern, die durch eine Immunfluoreszenzmarkierung von p65 nachgewiesen wurde. Durch die Vorinkubation mit 2 bzw. 4 mM Butyrat über 12, 24, 36 und 48 Stunden ließ sich eine sowohl zeit- als auch dosisabhängige Inhibition dieser nukleären NF- κ B-Translokation erreichen. Bei Verwendung von 4 mM Butyrat war, verglichen mit unbehandelten Zellen, eine signifikante ($p \leq 0,001$) Reduktion des Anteils von aktivem NF- κ B bereits nach einer 24stündigen Inkubation (TNF α ; IL-1 β : 36 h, $p = 0,025$), bei Anwendung von 2 mM Butyrat erst nach 36 h (TNF α ; IL-1 β : 48 h) festzustellen. Bei der direkten Gegenüberstellung von 2 mM und 4 mM Butyrat zeigte sich nach TNF α -Stimulation bereits nach 24 h ein signifikanter ($p = 0,004$) Vorteil der höheren Dosis, bei Verwendung von IL-1 β erst nach 36 h ($p = 0,047$). Die qualitativen Ergebnisse der Versuche an HeLa 229 ließen sich auch an den kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480 und SW620 nachweisen.

Bei Untersuchung des inhibitorischen I κ B α -Proteins mittels Western Blot konnte für die o. g. Zelllinien zunächst eine TNF α -induzierte Phosphorylierung von I κ B α nachgewiesen werden. Diese war an einer raschen Abnahme von I κ B α sowie Zunahme von Phospho-I κ B α zu erkennen. Durch eine 24stündige Präinkubation der Zellen mit 4 mM Butyrat war diese Phosphorylierung effektiv hemmbar: nach der Stimulation mit TNF α kam es zu einem deutlich geringeren Abfall von I κ B α , ein Anstieg von Phospho-I κ B α war nicht zu verzeichnen. Versuche an IL-1 β -stimulierten HeLa 229-Zellen erbrachten, gemeinsam mit den Ergebnissen zur NF- κ B-Translokation, Hinweise auf mögliche alternative, I κ B α -unabhängige Wege der NF- κ B-Aktivierung.

Hinsichtlich der klinischen Anwendung von Butyrat wurden Lamina propria-Makrophagen von Patienten mit einer distalen Colitis ulcerosa

durch eine neu etablierte immunhistochemische Doppelfärbung von NF- κ B (p65) und CD68 (ein Makrophagenmarker) untersucht. Bei unbehandelten Individuen ließ sich sowohl in den Biopsien der Verum- als auch der Placebogruppe in nahezu 80 % der Makrophagen eine nukleäre Translokation von NF- κ B nachweisen. Die topische Behandlung mit 100 mM Butyrat führte demgegenüber bereits nach 4 Wochen zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von Makrophagen mit einer nukleären Translokation von NF- κ B, sowohl innerhalb der Butyratgruppe ($p < 0,001$) als auch im Vergleich mit der Placebogruppe ($p < 0,001$). Dieser Effekt war auch nach 8 Wochen noch nachweisbar ($p < 0,001$). Zur Objektivierung der Befunde wurden die Biopsien ebenfalls histologisch untersucht: Die Dichte der neutrophilen Granulozyten im Krypten- und Oberflächenepithel wurde durch Butyrat gegenüber Placebo signifikant reduziert; alle übrigen morphologischen Entzündungsparameter änderten sich teilweise zwar deutlich, jedoch wurde hier nicht das Signifikanzniveau erreicht. Klinisch konnte unter Butyratbehandlung bereits nach 4 Wochen eine signifikante ($p = 0,011$) Abnahme des DAI festgestellt werden, nach 8 Wochen auch im Vergleich mit der Placebogruppe ($p = 0,009$). Signifikante endoskopische Veränderungen ergaben sich nur innerhalb der Butyratgruppe nach einer Behandlungsdauer von 8 Wochen ($p = 0,007$).

Was die Anwendung von Butyrat in der Behandlung der Colitis ulcerosa angeht, so konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß mit dieser kurzkettigen Fettsäure sowohl *in vitro* (an zytokinstimulierten Adenokarzinomzelllinien als Entzündungsmodell) als auch *in vivo* ein potenter und gleichzeitig kostengünstiger Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung zur Verfügung steht. So korreliert die im klinischen Teil dieser Untersuchung nachweisbare Reduktion der Entzündungsaktivität (DAI, Endoskopie-Score) mit

einer signifikanten Hemmung der NF- κ B-Translokation in Lamina propria-Makrophagen. Dennoch erscheinen, auch vor dem Hintergrund der geringen Fallzahlen, weitere Untersuchungen zur Anwendung von Butyrat bei Patienten mit einer Colitis ulcerosa sinnvoll. Gegenstand des Interesses sollten dabei insbesondere auch die neuen galenischen Zubereitungen von Butyrat (orale Verfügbarkeit) sowie Ideen zur Steigerung der intraluminalen Butyratkonzentration über diätetische Maßnahmen sein.

6 Literatur

- 1 Adams DO, Hamilton TA: The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 1984; 2:283-318
- 2 Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y: Stimulation-dependent I κ B α phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(23):10599-10603
- 3 Al-Sabbagh R, Sinicrope FA, Sellin JH, Shen Y, Rouben L: Evaluation of short-chain fatty acid enemas: treatment of radiation proctitis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(9):1814-1816
- 4 Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C: Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 1997; 110(Pt 3):369-378
- 5 Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 1995; 270(5234):286-290
- 6 Baenkler HW: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In: Baenkler HW et al., *Innere Medizin*. 1. Aufl. 1999. Hippokrates Verlag im Georg Thieme Verlag; Stuttgart. S. 1066-1080
- 7 Baeuerle PA, Baltimore D: NF- κ B: ten years after. *Cell* 1996; 87(1):13-20
- 8 Baeuerle PA, Baichwal VR: NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997; 65:111-137
- 9 Baldwin AS, Jr.: The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649-683

- 10 Bantel H, Berg C, Vieth M, Stolte M, Kruis W, Schulze-Osthoff K: Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF- κ B in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(12):3452-3457
- 11 Barnes PJ, Adcock I: Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14(12):436-441
- 12 Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336(15):1066-1071
- 13 Basson MD, Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA: Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 1996; 41(10):1989-1993
- 14 Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F, Cattan S, Gendre JP, Cosnes J: Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(7):2113-2116
- 15 Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D: Constitutive NF- κ B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I κ B α -deficient mice. *Genes Dev* 1995; 9(22):2736-2746
- 16 Bender K, Göttlicher M, Whiteside S, Rahmsdorf HJ, Herrlich P: Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- κ B by UV. *Embo J* 1998; 17(17):5170-5181
- 17 Béraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA: Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(2):429-434
- 18 Bernstein D, Rogers A: Malignancy in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(3):434-440
- 19 Binder HJ, Mehta P: Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. *Gastroenterology* 1989; 96(4):989-996

- 20 Biswas DK, Ahlers CM, Dezube BJ, Pardee AB: Pentoxifylline and other protein kinase C inhibitors down-regulate HIV-LTR NF- κ B induced gene expression. *Mol Med* 1994; 1(1):31-43
- 21 Bohmig GA, Krieger PM, Saemann MD, Wenhardt C, Pohanka E, Zlabinger GJ: n-butyrate downregulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids. *Immunology* 1997; 92(2):234-243
- 22 Breuer RI, Buto SK, Christ ML, Bean J, Vernia P, Paoluzi P, Di Paolo MC, Caprilli R: Rectal irrigation with short-chain fatty acids for distal ulcerative colitis - preliminary report. *Dig Dis Sci* 1991; 36(2):185-187
- 23 Breuer RI, Soergel KH, Lashner BA, Christ ML, Hanauer SB, Vanagunas A, Harig JM, Keshavarzian A, Robinson M, Sellin JH, Weinberg D, Vidican DE, Flemal KL, Rademaker AW: Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomized, placebo controlled trial. *Gut* 1997; 40(4):485-491
- 24 Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Stroka D, Soares M, Bach FH, Winkler H: Glucocorticoid-mediated repression of NF- κ B activity in endothelial cells does not involve induction of I κ B α synthesis. *J Biol Chem* 1996; 271(32):19612-19616
- 25 Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U: Control of I κ B- α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 1995; 267(5203):1485-1488
- 26 Bugaut M: Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B* 1987; 86(3):439-472
- 27 Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT: Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995; 9(4):401-412

- 28 Chapman MA, Grahn MF, Hutton M, Williams NS: Butyrate metabolism in the terminal ileal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Br J Surg* 1995; 82(1):36-38
- 29 Chapman MA, Grahn MF, Boyle MA, Hutton M, Rogers J, Williams NS: Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut* 1994; 35(1):73-76
- 30 Chen LF, Mu Y, Greene WC: Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B. *Embo J* 2002; 21(23):6539-6548
- 31 Clarke CJ, Hales A, Hunt A, Foxwell BM: IL-10-mediated suppression of TNF- α production is independent of its ability to inhibit NF- κ B activity. *Eur J Immunol* 1998; 28(5):1719-1726
- 32 Clausen MR, Mortensen PB: Kinetic studies on the metabolism of short-chain fatty acids and glucose by isolated rat colonocytes. *Gastroenterology* 1994; 106(2):423-432
- 33 Clausen MR, Mortensen PB: Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut* 1995; 37(5):684-689
- 34 Clausen MR, Tvede M, Mortensen PB: Short-chain fatty acids in pouch contents from patients with and without pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Gastroenterology* 1992; 103(4):1144-1153
- 35 Conner EM, Brand S, Davis JM, Laroux FS, Palombella VJ, Fuseler JW, Kang DY, Wolf RE, Grisham MB: Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282(3):1615-1622
- 36 Cook SI, Sellin JH: Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12(6):499-507
- 37 Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP: Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1996; 110(2):424-431

- 38 Cummings JH: Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 1981; 22(9):763-779
- 39 Cummings JH: Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet* 1983; 1(8335):1206-1209
- 40 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(10):1221-1227
- 41 D'Argenio G, Cosenza V, Sorrentini I, De Ritis F, Gatto A, Delle Cave M, D'Armiento FP, Mazzacca G: Butyrate, mesalamine, and factor XIII in experimental colitis in the rat: effects on transglutaminase activity. *Gastroenterology* 1994; 106(2):399-404
- 42 De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E, Haegeman G: Glucocorticoids repress NF- κ B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(8):3919-3924
- 43 de Martin R, Vanhove B, Cheng Q, Hofer E, Csizmadia V, Winkler H, Bach FH: Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I κ B α -like gene is regulated by NF- κ B. *Embo J* 1993; 12(7):2773-2779
- 44 Den Hond E, Hiele M, Evenepoel P, Peeters M, Ghooys Y, Rutgeerts P: In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998; 115(3):584-590
- 45 D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P: Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998; 114(2):262-267
- 46 DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M: A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 1997; 388(6642):548-554

- 47 Dignass A, Goebell H: Fortschritte in der Ätiologie- und Pathogenese-forschung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Inter-nist* 1998; 39(10):1004-1012
- 48 Eder M: Verdauungstrakt - Darm. In: Eder M et al., *Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*. 33. Aufl. 1990. Springer Verlag; Berlin-Heidelberg-New York. S. 537-584
- 49 Egan LJ, Mays DC, Huntoon CJ, Bell MP, Pike MG, Sandborn WJ, Lipsky JJ, McKean DJ: Inhibition of interleukin-1-stimulated NF- κ B RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity. *J Biol Chem* 1999; 274(37):26448-26453
- 50 Ekbom A, Kornfeld D: Sulphasalazine use as a preventive factor for colorectal cancer in ulcerative colitis patients - a review. *Inflamm Bowel Dis* 1996; 2(4):276-278
- 51 Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO: Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323(18):1228-1233
- 52 Fan CM, Maniatis T: Generation of p50 subunit of NF- κ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* 1991; 354(6352):395-398
- 53 Farmer RG, Hamilton SR, Morson BC, Stein GN, Sabri PJ, Fazio VW: Ulcerative Colitis. In: Berk I, *Bockus GASTROENTEROLOGY*. 4. Aufl. 1985. W. B. Saunders; Philadelphia. S. 2137-2225
- 54 Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M: Bacterial lipopolysaccharide activates NF- κ B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275(15):11058-11063.
- 55 Feiereis H, Jantschek G: Colitis ulcerosa. In: Adler RH et al., *Uex-küll - Psychosomatische Medizin*. 5. Aufl. 1998. Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore. S. 839-852

- 56 Feinman R, Clarke KO, Harrison LE: Phenylbutyrate-induced apoptosis is associated with inactivation of NF- κ B in HT-29 colon cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49(1):27-34
- 57 Finnie IA, Taylor BA, Rhodes JM: Ileal and colonic epithelial metabolism in quiescent ulcerative colitis: increased glutamine metabolism in distal colon but no defect in butyrate metabolism. *Gut* 1993; 34(11):1552-1558
- 58 Fleckenstein JM, Kopecko DJ: Breaching the mucosal barrier by stealth: an emerging pathogenic mechanism for enteroadherent bacterial pathogens. *J Clin Invest* 2001; 107(1):27-30
- 59 Frankel WL, Zhang W, Singh A, Klurfeld DM, Don S, Sakata T, Modlin I, Rombeau JL: Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* 1994; 106(2):375-380
- 60 Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Keefe SJ, O'Neill EA: Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I κ B/MAD3, an inhibitor of NF- κ B. *Embo J* 1994; 13(4):861-870
- 61 Fusunyan RD, Quinn JJ, Fujimoto M, MacDermott RP, Sanderson IR: Butyrate switches the pattern of chemokine secretion by intestinal epithelial cells through histone acetylation. *Mol Med* 1999; 5(9):631-640.
- 62 George J, Present DH, Pou R, Bodian C, Rubin PH: The long-term outcome of ulcerative colitis treated with 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(9):1711-1714
- 63 Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:225-260
- 64 Ghosh S, Shand A, Ferguson A: Ulcerative colitis. *BMJ* 2000; 320(7242):1119-1123

- 65 Gibson P, Rosella O: Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells in vitro: response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37(4):536-543
- 66 Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP: Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7(2):165-172
- 67 Gilbert KM, Weigle WO: Th1 cell anergy and blockade in G1a phase of the cell cycle. *J Immunol* 1993; 151(3):1245-1254
- 68 Guillemot F, Colombel JF, Neut C, Verplanck N, Lecomte M, Romond C, Paris JC, Cortot A: Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. Prospective and double-blind study. *Dis Colon Rectum* 1991; 34(10):861-864
- 69 Gum JR, Kam WK, Byrd JC, Hicks JW, Sleisenger MH, Kim YS: Effects of sodium butyrate on human colonic adenocarcinoma cells. Induction of placental-like alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 1987; 262(3):1092-1097
- 70 Hague A, Paraskeva C: The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *Eur J Cancer Prev* 1995; 4(5):359-364
- 71 Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM: Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med* 1989; 320(1):23-28
- 72 Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Deitch EA: Sulphasalazine inhibits macrophage activation: inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase expression, interleukin-12 production and major histocompatibility complex II expression. *Immunology* 2001; 103(4):473-478
- 73 Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P, Cato AC: I κ B α -independent downregulation of NF- κ B activity by glucocorticoid receptor. *Embo J* 1997; 16(15):4698-4707
- 74 Herfarth HH, Bocker U, Janardhanam R, Sartor RB: Subtherapeutic corticosteroids potentiate the ability of interleukin 10 to prevent

- chronic inflammation in rats. *Gastroenterology* 1998; 115(4):856-865
- 75 Herlaar E, Brown Z: p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1999; 5(10):439-447
- 76 Hill MJ: Bacterial fermentation of complex carbohydrate in the human colon. *Eur J Cancer Prev* 1995; 4(5):353-358
- 77 Hill MJ, Drasar BS: The normal colonic bacterial flora. *Gut* 1975; 16(4):318-323
- 78 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. *J Nutr* 2002; 132(5):1012-1017
- 79 Hugot JP, Zouali H, Lesage S, Thomas G: Etiology of the inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14(1):2-9
- 80 Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G: The crystal structure of the $I\kappa B\alpha$ /NF- κB complex reveals mechanisms of NF- κB inactivation. *Cell* 1998; 95(6):759-770
- 81 Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C: The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF- κB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 2000; 118(4):724-734
- 82 Jacobs MD, Harrison SC: Structure of an $I\kappa B\alpha$ /NF- κB complex. *Cell* 1998; 95(6):749-758
- 83 Jobin C, Haskill S, Mayer L, Panja A, Sartor RB: Evidence for altered regulation of $I\kappa B\alpha$ degradation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* 1997; 158(1):226-234
- 84 Jobin C, Hellerbrand C, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB: Mediation by NF- κB of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut* 1998; 42(6):779-787

- 85 Jobin C, Panja A, Hellerbrand C, Iimuro Y, Didonato J, Brenner DA, Sartor RB: Inhibition of proinflammatory molecule production by adenovirus-mediated expression of a nuclear factor κ B super-repressor in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1998; 160(1):410-418
- 86 Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF: A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995; 95(1):55-65
- 87 Kagnoff MF, Eckmann L: Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997; 100(1):6-10
- 88 Kaiser GC, Yan F, Polk DB: Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor κ B activation in mouse colonocytes. *Gastroenterology* 1999; 116(3):602-609
- 89 Kanauchi O, Andoh A, Iwanaga T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Toyonaga A, Bamba T: Germinated barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14(12):1173-1179
- 90 Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS, Jr.: Inhibition of NF- κ B activity by thalidomide through suppression of I κ B kinase activity. *J Biol Chem* 2001; 276(25):22382-22387
- 91 Kim YI: Short-chain fatty acids in ulcerative colitis. *Nutr Rev* 1998; 56(1 Pt 1):17-24
- 92 Kopp E, Ghosh S: Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265(5174):956-959
- 93 Korelitz BI: Inflammatory Bowel Disease and Cancer. In: Berk I, *Bockus GASTROENTEROLOGY*. 4. Aufl. 1985. W. B. Saunders; Philadelphia. S. 2346-2361
- 94 Kripke SA, Fox AD, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL: Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1989; 13(2):109-116

- 95 Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M: Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11(5):853-858
- 96 Kühn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75(2):263-274
- 97 Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta J, Kuroiwa A, Ina K, Kanayama K, Ando T, Matsuura T, et al.: Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci* 1995; 40(5):949-959
- 98 Kvietys PR, Granger DN: Effect of volatile fatty acids on blood flow and oxygen uptake by the dog colon. *Gastroenterology* 1981; 80(5 Pt 1):962-969.
- 99 Lai JH, Tan TH: CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I κ B α which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J Biol Chem* 1994; 269(48):30077-30080
- 100 Leach MW, Davidson NJ, Fort MM, Powrie F, Rennick DM: The role of IL-10 in inflammatory bowel disease: "of mice and men". *Toxicol Pathol* 1999; 27(1):123-133
- 101 Lee JI, Ganster RW, Geller DA, Burckart GJ, Thomson AW, Lu L: Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. *Transplantation* 1999; 68(9):1255-1263
- 102 Li N, Karin M: Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF- κ B through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(22):13012-13017
- 103 Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, Michelassi F, Hanauer S: Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med* 1994; 330(26):1841-1845

- 104 Lührs H, Kudlich T, Neumann M, Schauber J, Melcher R, Gostner A, Scheppach W, Menzel TP: Butyrate-enhanced TNF α -induced apoptosis is associated with inhibition of NF- κ B. *Anticancer Res* 2002; 22(3):1561-1568
- 105 MacDermott RP: Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol* 1999; 19(5):266-272.
- 106 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL: Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51(1):2-9
- 107 MacFarlane GT, Gibson GR, Cummings JH: Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 1992; 72(1):57-64
- 108 Mahida YR: The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6(1):21-33.
- 109 Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D: MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997; 385(6616):540-544
- 110 Marshall JK, Irvine EJ: Rectal aminosalicylate therapy for distal ulcerative colitis: a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9(3):293-300
- 111 Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J: PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 1999; 99(24):3125-3131
- 112 Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L: Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 100(1):3-12
- 113 McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, McCormick PA, Sheahan K, Baird AW: Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 2001; 50(10):491-495

- 114 McNeil NI, Cummings JH, James WP: Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut* 1978; 19(9):819-822
- 115 McNeil NI, Ling KL, Wager J: Mucosal surface pH of the large intestine of the rat and of normal and inflamed large intestine in man. *Gut* 1987; 28(6):707-713
- 116 Melcher EA, Levitt MD, Slavin JL: Methane production and bowel function parameters in healthy subjects on low- and high-fiber diets. *Nutr Cancer* 1991; 16(2):85-92
- 117 Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A: IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 1997; 278(5339):860-866
- 118 Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K: IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 96(3):432-436
- 119 Moody GA, Jayanthi V, Probert CS, Mac Kay H, Mayberry JF: Long-term therapy with sulphasalazine protects against colorectal cancer in ulcerative colitis: a retrospective study of colorectal cancer risk and compliance with treatment in Leicestershire. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8(12):1179-1183
- 120 Mortensen FV, Nielsen H, Mulvany MJ, Hessov I: Short chain fatty acids dilate isolated human colonic resistance arteries. *Gut* 1990; 31(12):1391-1394
- 121 Mortensen PB, Clausen MR: Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 216:132-148
- 122 Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K: Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 1994; 269(18):13289-13295

- 123 Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K: Differential regulation of I κ B kinase α and β by two upstream kinases, NF- κ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(7):3537-3542
- 124 Nathan CF: Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79(2):319-326
- 125 Neurath MF, Pettersson S: Predominant role of NF-kappa B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology* 1997; 198(1-3):91-98
- 126 Neurath MF, Schürmann G: Zur Immunopathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Chirurg* 2000; 71(1):30-40
- 127 Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Büschenfelde KH, Strober W: Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996; 2(9):998-1004
- 128 Neurath MF, Fuss I, Schürmann G, Pettersson S, Arnold K, Müller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C, Meyer zum Büschenfelde KH: Cytokine gene transcription by NF- κ B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 859:149-159
- 129 Newmark HL, Lupton JR, Young CW: Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett* 1994; 78(1-3):1-5
- 130 Nordgaard I, Mortensen PB: Digestive processes in the human colon. *Nutrition* 1995; 11(1):37-45
- 131 Oliva-Hemker M, Fiocchi C: Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8(2):112-128
- 132 Otaka M, Singhal A, Hakomori S: Antibody-mediated targeting of differentiation inducers to tumor cells: inhibition of colonic cancer

- cell growth in vitro and in vivo. A preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158(1):202-208
- 133 Otto HF: Kolon und Rektum. In: Böcker W et al., *Pathologie*. 1. Aufl. 1997. Urban & Schwarzenberg; München-Wien-Baltimore. S. 644-650
- 134 Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49):6853-6866
- 135 Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T: The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 1994; 78(5):773-785
- 136 Panes J: Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. *Acta Physiol Scand* 2001; 173(1):159-165
- 137 Patz J, Jacobsohn WZ, Gottschalk-Sabag S, Zeides S, Braverman DZ: Treatment of refractory distal ulcerative colitis with short chain fatty acid enemas. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(4):731-734
- 138 Pena AS, Crusius JB: Genetics of inflammatory bowel disease: implications for the future. *World J Surg* 1998; 22(4):390-393
- 139 Peters RT, Maniatis T: A new family of IKK-related kinases may function as I κ B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471(2):M57-62
- 140 Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T: Salicylates inhibit I κ B- α phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 1996; 156(10):3961-3969
- 141 Podolsky DK: Inflammatory bowel disease (2). *N Engl J Med* 1991; 325(14):1008-1016
- 142 Podolsky DK: Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med* 1991; 325(13):928-937

- 143 Que FG, Gores GJ: Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 1996; 110(4):1238-1243
- 144 Ray A, Prefontaine KE: Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(2):752-756
- 145 Roediger WE: The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet* 1980; 2(8197):712-715
- 146 Roediger WE: Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 1980; 21(9):793-798
- 147 Roediger WE: Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 1982; 83(2):424-429
- 148 Roediger WE: The starved colon - diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. *Dis Colon Rectum* 1990; 33(10):858-862
- 149 Rogler G, Andus T: Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22(4):382-389
- 150 Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Schölmerich J, Gross V: Nuclear factor κ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115(2):357-369
- 151 Romano MF, Lamberti A, Petrella A, Bisogni R, Tassone PF, Formisano S, Venuta S, Turco MC: IL-10 inhibits nuclear factor- κ B/Rel nuclear activity in CD3-stimulated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 1996; 156(6):2119-2123
- 152 Rosien U, Goebell H: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In: Layer P et al., *Praktische Gastroenterologie*. 1. Aufl. 1996. Urban & Schwarzenberg; München-Wien-Baltimore. S. 261-278

- 153 Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M: IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 1998; 395(6699):297-300
- 154 Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt MG, Jr.: Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* 1980; 78(6):1500-1507
- 155 Ryseck RP, Novotny J, Bravo R: Characterization of elements determining the dimerization properties of RelB and p50. *Mol Cell Biol* 1995; 15(6):3100-3109
- 156 Saemann MD, Böhmig GA, Österreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stöckl J, Hörl WH, Zlabinger GJ: Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *Faseb J* 2000; 14(15):2380-2382.
- 157 Sagar PM, Taylor BA, Godwin P, Holdsworth PJ, Johnston D, Lewis W, Miller A, Quirke P, Williamson M: Acute pouchitis and deficiencies of fuel. *Dis Colon Rectum* 1995; 38(5):488-493
- 158 Saini K, Steele G, Thomas P: Induction of carcinoembryonic-antigen-gene expression in human colorectal carcinoma by sodium butyrate. *Biochem J* 1990; 272(2):541-544
- 159 Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W: I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* 1999; 274(43):30353-30356
- 160 Sands BE: Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118(2 Suppl 1):S68-82
- 161 Sartor RB: Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(12 Suppl):5S-11S
- 162 Sartor RB: Postoperative recurrence of Crohn's disease: the enemy is within the fecal stream. *Gastroenterology* 1998; 114(2):398-400

- 163 Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr.: Role of transcriptional activation of $I\kappa B\alpha$ in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270(5234):283-286
- 164 Scheppach W: Kurzkettige Fettsäuren und Dickdarm - Physiologie, Pathophysiologie und Therapie. *Akt Ernähr Med* 1995; 20:74-78
- 165 Scheppach W: Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Dig Dis Sci* 1996; 41(11):2254-2259
- 166 Scheppach W, Bartram HP, Richter F: Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A(7-8):1077-1080
- 167 Scheppach W, Bartram P, Richter A, Richter F, Liepold H, Dusel G, Hofstetter G, Rütthlein J, Kasper H: Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1992; 16(1):43-48
- 168 Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H: Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992; 103(1):51-56
- 169 Scheppach W, Müller JG, Boxberger F, Dusel G, Richter F, Bartram HP, Christl SU, Dempfle CE, Kasper H: Histological changes in the colonic mucosa following irrigation with short-chain fatty acids. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9(2):163-168
- 170 Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW: Signal-induced degradation of $I\kappa B\alpha$ requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(24):11259-11263
- 171 Schmitz ML, dos Santos Silva MA, Baeuerle PA: Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF- κB . Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* 1995; 270(26):15576-15584
- 172 Schölmerich J: Gibt es Neues in der Standardtherapie der CED? *Internist* 1999; 40(12):1288-1299

- 173 Schottelius AJ, Baldwin AS, Jr.: A role for transcription factor NF- κ B in intestinal inflammation. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14(1):18-28
- 174 Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS, Jr.: Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274(45):31868-31874
- 175 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J: Activation of nuclear factor κ B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42(4):477-484
- 176 Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A: Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108(5):1434-1444
- 177 Schröder O, Stein J: Kurzkettige Fettsäuren - Physiologie und pathologische Implikationen. *Akt Ernähr Med* 1997; 22:86-96
- 178 Schröder O, Opritz J, Stein J: Substrate and inhibitor specificity of butyrate uptake in apical membrane vesicles of the rat distal colon. *Digestion* 2000; 62(2-3):152-158
- 179 Schwartz AL, Ciechanover A: The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med* 1999; 50:57-74
- 180 Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I κ B α phosphorylation and degradation. *Mol Cell Biol* 1998; 18(1):78-84
- 181 Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galliche JP: Butyrate inhibits inflammatory responses through NF- κ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47(3):397-403.
- 182 Sellin JH, DeSoignie R: Short-chain fatty acid absorption in rabbit colon in vitro. *Gastroenterology* 1990; 99(3):676-683
- 183 Sen R, Baltimore D: Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47(6):921-928

- 184 Senagore AJ, MacKeigan JM, Scheider M, Ebroim JS: Short-chain fatty acid enemas: a cost-effective alternative in the treatment of nonspecific proctosigmoiditis. *Dis Colon Rectum* 1992; 35(10):923-927
- 185 Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M: Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996; 39(5):690-697
- 186 Siavoshian S, Blottiere HM, Bentouimou N, Cherbut C, Galmiche JP: Butyrate enhances major histocompatibility complex class I, HLA-DR and ICAM-1 antigen expression on differentiated human intestinal epithelial cells. *Eur J Clin Invest* 1996; 26(9):803-810
- 187 Singh S, Darnay BG, Aggarwal BB: Site-specific tyrosine phosphorylation of I κ B α negatively regulates its inducible phosphorylation and degradation. *J Biol Chem* 1996; 271(49):31049-31054
- 188 Sizemore N, Leung S, Stark GR: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF- κ B p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* 1999; 19(7):4798-4805
- 189 Soergel KH: Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Investig* 1994; 72(10):742-748
- 190 Solomon MJ, Schnitzler M: Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment. *World J Surg* 1998; 22(4):352-358
- 191 Steinhart AH, Brzezinski A, Baker JP: Treatment of refractory ulcerative proctosigmoiditis with butyrate enemas. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(2):179-183
- 192 Steinhart AH, Hiruki T, Brzezinski A, Baker JP: Treatment of left-sided ulcerative colitis with butyrate enemas: a controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10(5):729-736

- 193 Stenson WF: Inflammatory bowel disease. In: Yamada T et al., *Textbook of Gastroenterology*. 2. Aufl. 1995. J. B. Lippincott Company; Philadelphia. S. 1748-1806
- 194 Stephen AM, Haddad AC, Phillips SF: Passage of carbohydrate into the colon. Direct measurements in humans. *Gastroenterology* 1983; 85(3):589-595
- 195 Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB: Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992; 37(6):818-826
- 196 Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD: A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999; 104(4):383-389
- 197 Sutherland LR, Roth DE, L. BP: Alternatives to sulphasalazine: a meta-analysis of 5-ASA in the treatment of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 1997; 3(2):65-78
- 198 Sutherland LR, Martin F, Greer S, Robinson M, Greenberger N, Saibil F, Martin T, Sparr J, Prokipchuk E, Borgen L: 5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis. *Gastroenterology* 1987; 92(6):1894-1898
- 199 Suyang H, Phillips R, Douglas I, Ghosh S: Role of unphosphorylated, newly synthesized I κ B β in persistent activation of NF- κ B. *Mol Cell Biol* 1996; 16(10):5444-5449
- 200 Thanos D, Maniatis T: NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 80(4):529-532
- 201 Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ: Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996; 312(7023):95-96

- 202 Tobin MV, Logan RF, Langman MJ, McConnell RB, Gilmore IT: Cigarette smoking and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1987; 93(2):316-321
- 203 Topping DL, Clifton PM: Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001; 81(3):1031-1064
- 204 Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA: Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* 1995; 14(12):2876-2883
- 205 Uehara T, Matsuno J, Kaneko M, Nishiya T, Fujimuro M, Yokosawa H, Nomura Y: Transient Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Activation Stimulated by Interleukin-1 β May Be Partly Dependent on Proteasome Activity, but Not Phosphorylation and Ubiquitination of the I κ B α Molecule, in C6 Glioma Cells. *J Biol Chem* 1999; 274(22):15875-15882
- 206 Ulevitch RJ, Tobias PS: Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(1):19-22
- 207 van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN: Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997; 113(2):383-389
- 208 Vélazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL: Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci* 1996; 41(4):727-739
- 209 Vernia P, Cittadini M, Caprilli R, Torsoli A: Topical treatment of refractory distal ulcerative colitis with 5-ASA and sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 1995; 40(2):305-307
- 210 Vernia P, Marcheggiano A, Caprilli R, Frieri G, Corrao G, Valpiani D, Di Paolo MC, Paoluzi P, Torsoli A: Short-chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9(3):309-313

- 211 Vernia P, Fracasso PL, Casale V, Villotti G, Marcheggiano A, Stigliano V, Pinnaro P, Bagnardi V, Caprilli R: Topical butyrate for acute radiation proctitis: randomised, crossover trial. *Lancet* 2000; 356(9237):1232-1235.
- 212 Vernia P, Monteleone G, Grandinetti G, Villotti G, Di Giulio E, Frieri G, Marcheggiano A, Pallone F, Caprilli R, Torsoli A: Combined oral sodium butyrate and mesalazine treatment compared to oral mesalazine alone in ulcerative colitis: randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Dig Dis Sci* 2000; 45(5):976-981
- 213 von Herbay A: Karzinome bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Internist* 1998; 39(10):1024-1029
- 214 Wächtershäuser A, Stein J: Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr* 2000; 39(4):164-171
- 215 Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM: Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998; 101(5):1163-1174
- 216 Wang CY, Cusack JC, Jr., Liu R, Baldwin AS, Jr.: Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nat Med* 1999; 5(4):412-417
- 217 Wang D, Baldwin AS: Activation of nuclear factor- κ B-dependent transcription by tumor necrosis factor- α is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* 1998; 273(45):29411-29416.
- 218 Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM: Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270(16):9558-9563
- 219 Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM: Suppression of NF- κ B Activity by Sulfasalazine Is Mediated by Direct Inhibition of I κ B Kinases alpha and beta. *Gastroenterology* 2000; 119(5):1209-1218

- 220 White MW: Metabolism of the malignant cell, in vivo, is anaerobic and significantly plays a factor in the pathway to carcinogenesis. *Med Hypotheses* 1992; 39(4):323-333
- 221 Whitehead RH, Young GP, Bhathal PS: Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). *Gut* 1986; 27(12):1457-1463
- 222 Wilson L, Szabo C, Salzman AL: Protein kinase C-dependent activation of NF- κ B in enterocytes is independent of I κ B degradation. *Gastroenterology* 1999; 117(1):106-114
- 223 Wischmeyer P, Pemberton JH, Phillips SF: Chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis: responses to butyrate and glutamine suppositories in a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1993; 68(10):978-981
- 224 Wolin MJ: Fermentation in the rumen and human large intestine. *Science* 1981; 213(4515):1463-1468
- 225 Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H: Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993; 341(8858):1437-1439
- 226 Yan F, Polk DB: Aminosalicylic acid inhibits I κ B kinase alpha phosphorylation of I κ B α in mouse intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274(51):36631-36636
- 227 Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y: Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature* 1998; 396(6711):590-594
- 228 Yin L, Laevsky G, Giardina C: Butyrate Suppression of Colonocyte NF- κ B Activation and Cellular Proteasome Activity. *J Biol Chem* 2001; 276(48):44641-44646
- 229 Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB: The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* 1998; 396(6706):77-80

- 230 Zandi E, Chen Y, Karin M: Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science* 1998; 281(5381):1360-1363
- 231 Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M: The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 1997; 91(2):243-252
- 232 Zelvyte I, Dominaitiene R, Crisby M, Janciauskiene S: Modulation of inflammatory mediators and PPAR γ and NF- κ B expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes in vitro. *Pharmacol Res* 2002; 45(2):147-154
- 233 Zhang G, Ghosh S: Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001; 107(1):13-19.

7 Anhang

7.1 Zellkulturmedien

Die hier aufgeführten Bestandteile der Kulturmedien wurden von der Firma Life Technologies GmbH (Karlsruhe) bezogen. Die Mengenangaben der Einzelkomponenten beziehen sich auf eine gebrauchsfertige Mediumgesamtmenge von 100 ml. Alle Stammlösungen und Kulturmedien wurden mit einem Amebocyte Lysate Assay (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) auf ihre Endotoxinfreiheit überprüft.

<i>HeLa 229:</i>	DMEM (41965-039)	88,0 ml
	L-Glutamin	1,0 ml
	Penicillin/Streptomycin	1,0 ml
	FBS	10,0 ml
<i>SW480:</i>	RPMI 1640 (21875-034)	90,0 ml
	FBS	10,0 ml
<i>SW620:</i>	DMEM (31885-023)	85,0 ml
	Penicillin/Streptomycin	5,0 ml
	FBS	10,0 ml

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

MEM = Minimum Essential Medium

FBS = Fetal Bovine Serum

NEAA = Nicht-essentielle Aminosäure-Lösung

7.2 Biopsien

7.2.1 Golytely-Abfuhrlösung

Inhalt: 1,46 g/l Natriumchlorid (NaCl)
0,75 g/l Kaliumchlorid (KCl)
1,68 g/l Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

5,68 g/l Natriumsulfat (Na_2SO_4)
 59,0 g/l Polyethylenglycol 4000
 (bezogen über die Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg)

7.2.2 Practo clyss-Einlauf

Inhalt: 160 g/l Natriumdihydrogenphosphat • $2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$)
 60 g/l Natriummonohydrogenphosphat • $12\text{H}_2\text{O}$
 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12\text{H}_2\text{O}$)
 1 g/l 4-Hydroxybenzoesäuremethylester ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$)
 0,1 g/l 4-Hydroxybenzoesäurepropylester ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$)
 (hergestellt von Fa. Fresenius, Bad Homburg)

7.2.3 Transportmedium

Inhalt: 490 ml Basal Medium Eagle (Gibco BRL, Paisley, Schottland)
 5 ml Antibiotic-Antimycotic (Gibco BRL)
 5 ml L-Glutamine 200 mM (Gibco BRL)

7.2.4 Alkoholreihen

Die für Dehydrierung, Rehydrierung und Entparaffinierung mittels auf- und absteigender Alkoholreihe verwendeten Lösungen wurden aus Aqua bidest. und 100 %igem Ethanol (J. T. Baker B. V., Deventer, Holland) hergestellt.

Absteigende Alkoholreihe: Entparaffinierung, Rehydrierung

(Wärmeschrank, 60 °C, 30 Minuten; nur bei der Entparaffinierung!)

- | | | |
|-----------------------------|-----|------------|
| • Xylol (J. T. Baker B. V.) | 3 x | 10 Minuten |
| • 100 %iges Ethanol | 2 x | 5 Minuten |
| • 96 %iges Ethanol | 3 x | 5 Minuten |
| • 80 %iges Ethanol | 2 x | 5 Minuten |
| • 70 %iges Ethanol | 3 x | 5 Minuten |

- 50 %iges Ethanol 2 x 5 Minuten
- Aqua bidest. 2 x 5 Minuten

Aufsteigende Alkoholreihe: Dehydrierung

- Aqua bidest. 2 x 1 – 2 Minuten
- 50 %iges Ethanol 2 x 1 – 2 Minuten
- 70 %iges Ethanol 3 x 1 – 2 Minuten
- 80 %iges Ethanol 2 x 1 – 2 Minuten
- 96 %iges Ethanol 3 x 1 – 2 Minuten
- 100 %iges Ethanol 2 x 1 – 2 Minuten
- Xylol (J. T. Baker B. V.) 3 x 1 – 2 Minuten

7.2.5 Eiweiß-Glycerin-Lösung („Streckwasser“)

Inhalt: 40 ml Aqua bidest.
 10 ml Aceton (J. T. Baker B. V.)
 0,5 ml Eiweiß-Glycerin aus Hühnereiweiß
 (Chroma-Gesellschaft Schmid, Köngen)

7.2.6 Paraformaldehyd-Fixation (4 % und 10 %)

Materialien: 4 g (4 %) bzw 10 g (10 %) Paraformaldehyd
 (Merck KGaA, Darmstadt)
 100 ml PBS 0,01 M, pH 7,4 (siehe 7.3.1)

Herstellung: Das Paraformaldehyd wurde auf einem Wärmemagnetrührer (IKAMAG RH, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen) in PBS gelöst. Dies erfolgte in einer abgedunkelten Flasche, um die lichtabhängige Bildung von Ameisensäure zu vermeiden. Insgesamt benötigte der Lösungsvorgang ca. eine Stunde, wobei für mindestens 30 Minuten eine Temperatur von 80 °C erforderlich war. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe eines Faltenfilters (Durchmesser 185 mm, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert und der pH-Wert mit Natronlauge (NaOH, Merck KGaA) auf 8,4 eingestellt.

7.3 Immunhistochemie / Immunfluoreszenz

7.3.1 Phosphate Buffered Saline (PBS) 0,01 M, pH 7,4

Materialien: 1,48 g di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$)
0,43 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)
7,2 g Natriumchlorid (NaCl)
(alle Merck KGaA)
1000 ml Aqua bidest.

Herstellung: Bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher pH-Metrie (Microprocessor pH-Meter pH537, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) auf einem Magnetrührer (IKAMAG REO, Janke & Kunkel GmbH & Co KG). Gegebenenfalls wurde der pH-Wert mittels Natronlauge bzw. Salzsäure (HCl , Merck KGaA) auf 7,4 angeglichen.

7.3.2 Methanol/Glycin-Fixation

Materialien: 375 mg Glycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
100 ml Aqua bidest.
210 ml Methanol (J. T. Baker B. V.)

Herstellung: Zunächst wurden das Glycin und Aqua bidest. auf einem Magnetrührer (IKAMAG REO, Janke & Kunkel GmbH & Co KG) miteinander vermischt und der pH-Wert mittels 2N Salzsäure auf 2,5 eingestellt. 90 ml der entstandenen Lösung und 210 ml Methanol ergaben das fertige Fixans. Die Aufbewahrung erfolgte in einer Küvette bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

7.3.3 PBS/Triton[®]X-100 0,1 %

Inhalt: 2,5 ml Triton[®]X-100 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
250 ml PBS 0,01 M, pH 7,4 (siehe 7.3.1)

7.3.4 PBS/BSA 0,2 %

Inhalt: 6,66 ml BSA 30 % (BSA, Bovine Specific Albumin, DADE Behring GmbH, Marburg)
1000 ml PBS 0,01 M, pH 7,4 (siehe 7.3.1)

7.3.5 Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz/-histochemie

Die aufgeführten Primärantikörper (*Tab. 6*) wurden für die Immunfluoreszenzfärbung von NF- κ B (p65) an Zellen sowie Biopsien mit PBS 0,01 M, pH 7,4 (siehe 7.3.1) verdünnt. Für die immunenzymatische Doppelmarkierung von NF- κ B (p65) und CD68 an Biopsien erfolgte die Verdünnung mit TBS/BSA 1 % (siehe 7.3.7).

Tab. 6: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz und Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper, deren Verdünnung sowie Spezifität.

Antigen	Typ	Spezies	Verdünnung	Inkubationszeit
NF- κ B (p65)*	polyklonal	Kaninchen	1 : 400	60 Minuten
CD68**	monoklonal	Maus	1 : 100	60 Minuten

* Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

** Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

Für die Detektion der entsprechenden Primärantikörper mittels Immunfluoreszenz kam ein Cy3TM-konjugierter Sekundärantikörper zum Einsatz (*Tab. 7*). Die Verarbeitung erfolgte unter weitgehender Vermeidung von

Tab. 7: Übersicht über die in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie verwendeten Sekundärantikörper sowie deren Spezifität, Konjugat und Verdünnung.

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-Kaninchen*	Ziege	Cy3 TM	1 : 800	60 Minuten
Anti-Kaninchen**	Ziege	Peroxidase	Fertiglösung***	30 Minuten
Anti-Maus**	Ziege	Alkalische Phosphatase	1 : 50	30 Minuten

* Jackson ImmunoResearch Laboratories, über Dianova GmbH, Hamburg

** Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

*** Dako EnVision+TM-System

Lichteinstrahlung, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Präparate so weit wie möglich zu vermeiden. Dilutiert wurde der Cy3[™]-konjugierte Sekundäntikörper mit PBS 0,01 M, pH 7,4 (siehe 7.3.1).

7.3.6 Tris Buffered Saline (TBS): 0,05 M Tris/HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6

Materialien: 6,05 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris/HCl) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
8,77 g Natriumchlorid (NaCl) (Merck KGaA)
1000 ml Aqua bidest.

Herstellung: Bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher pH-Metrie. Gegebenenfalls wurde der pH-Wert mittels Natronlauge bzw. Salzsäure angeglichen.

7.3.7 TBS/BSA 1 %

Inhalt: 10 ml TBS 0,05 M Tris/HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6
333 µl BSA 30 %

7.3.8 Darstellung der Alkalische Phosphatase-Aktivität in blau

Materialien: 20 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
2 ml N,N-Dimethylformamid (Carl Roth GmbH & Co)
98 ml Tris/HCl-Puffer 100 mM, pH 8,5 (Merck KGaA)

Herstellung: Zunächst wurde das Naphthol-AS-MX-Phosphat im N,N-Dimethyl-formamid gelöst, mit Tris/HCl-Puffer verdünnt, in Aliquots à 5 ml aufgeteilt und anschließend bei -20 °C aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 1 mg Fast Blue BB-Salz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) je Aliquot. Zur Blockade der endogenen Alkalischen Phosphatase wurden 5 Tropfen Levamisole (Dako Diagnostika GmbH) hinzugegeben.

7.4 Western Blot

7.4.1 Lysis Puffer

Basislösung (pH 7,4)

Materialien: 20 ml Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (pH 7,4) 1 M (Merck KGaA)
10 ml Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure 0,1 M
0,5 ml Trinatriummonovanadat (Na_3VO_4) 0,1 M
2,1 mg Natriumfluorid
(alle Chemikalien: Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
1000 ml Aqua bidest.

Herstellung: Nach dem Mischen der Zutaten wurde der pH-Wert des Puffers mittels Natronlauge bzw. Salzsäure auf exakt 7,4 eingestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

Lysis Puffer + Zusätze

Inhalt: 12,5 μl Aprotinin 0,01 U/ml
100 μl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 0,1 M/l
400 μl Pepstatin 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(alle Chemikalien: Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
10 ml Lysis Puffer (Basislösung, s. o.)

7.4.2 Sample Puffer

Materialien: 25 ml Stacking Puffer (siehe 7.4.6)
10 ml Glycerol 10 %
4 g Sodiumdodecylsulfat (SDS)
30 mg Bromphenolblau
20 mg Pyronin Y
(alle Chemikalien: Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
40 ml Aqua bidest.

Herstellung: Zunächst wurden alle Zutaten gemischt, dann durch einen 0,2 μm -Filter (FP 030/3, Schleicher & Schuell) filtriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

7.4.3 Running Gel

Substrat	10 %iges Gel	12,5 %iges Gel	15 %iges Gel
Acrylamid 30 %	10,0 ml	12,5 ml	15,0 ml
Running Puffer (4 x)*	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Aqua bidest.	12,5 ml	10,0 ml	7,5 ml
APS**	150 μ l	150 μ l	150 μ l
TEMED***	15 μ l	15 μ l	15 μ l

* Herstellung siehe 7.4.4

** APS = Ammoniumpersulfat

*** TEMED = N,N,N',N'-Tetraethylendiamid

7.4.4 Running Puffer

Materialien: 90,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (= Trisbase)
 40 ml SDS 10 %
 (beide Chemiekalien: Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
 500 ml Aqua bidest.

Herstellung: Der pH-Wert des fertigen Puffers wurde mittels 5 N HCl auf 8,8 eingestellt, die fertige Lösung durch einen 0,2 μ m Filter (FP 030/3, Schleicher & Schuell) filtriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

7.4.5 Stacking Gel

Substrat	Gel	Minigel
Acrylamid 30 %	1,67 ml	0,33 ml
Stacking Puffer (4 x)*	2,5 ml	0,5 ml
Aqua bidest.	5,84 ml	1,17 ml
APS**	100 μ l	30 μ l
TEMED***	10 μ l	3 μ l

* Herstellung siehe 7.4.6

** APS = Ammoniumpersulfat

*** TEMED = N,N,N',N'-Tetraethylendiamid

7.4.6 Stacking Puffer

Materialien: 30,2 g Trisbase
40 ml SDS 10 %
500 ml Aqua bidest.

Herstellung: Einstellen des pH-Wertes der Lösung mit 5 N Salzsäure auf 6,8; Filtration durch einen 0,2 μm Filter (FP 030/3, Schleicher & Schuell), Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

7.4.7 Tris Buffered Saline (TBS): 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6

Inhalt: 1,21 g Tris/HCl
8,76 g NaCl
(beide Chemikalien: Merck KGaA)
1000 ml Aqua bidest.

7.4.8 Trockenmilchpuffer (5 %)

Inhalt: 25 mg Trockenmilchpulver (Fluka-BioChemika, Buchs, CH)
500 μl Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
10 ml Natriumazid (Merck KGaA)
500 ml TBS

7.4.9 Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot

Die für den Western Blot verwendeten Primärantikörper gegen Phospho-I κ B α und I κ B α (Tab. 8) wurden mit BSA-Blocking-Puffer (siehe 7.4.10) verdünnt.

Für die Detektion der im Western Blot verwendeten Primärantikörper mittels Chemilumineszenz wurde ein in TBS (siehe 7.4.7) verdünnter Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (Tab. 9) verwendet.

Tab. 8: Übersicht über die im Western Blot verwendeten Primärantikörper sowie deren Spezifität und Verdünnung.

Antigen	Typ	Spezies	Verdünnung	Inkubationszeit
Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^*$	polyklonal	Kaninchen	1 : 500	3 Stunden
$\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{**}$	polyklonal	Kaninchen	1 : 1000	3 Stunden

* Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA, USA

** New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus

Tab. 9: Übersicht über den im Western Blot verwendeten Sekundärantikörper sowie dessen Konjugat, Spezifität und Verdünnung.

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-Kaninchen*	Esel	Peroxidase	1 : 5000	60 Minuten

* Amersham International Biotech UK Ltd., Little Chalfont, UK

7.4.10 BSA-Blocking-Puffer

Inhalt: 30 g BSA
50 ml Trisbase
10 ml Natriumazid
500 ml Aqua bidest

7.4.11 Stripping Puffer

Inhalt: 7,813 ml 2-Mercaptoethanol 100 mM
20 g SDS 2 %
7,57 g Tris-HCl 62,5 mM
1000 ml Aqua bidest.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach danke ich vielmals für die Überlassung des Promotionsthemas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zur Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit im Labor des Schwerpunktes für Gastroenterologie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg.

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Timmermann möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Für die Betreuung während der experimentellen Phase drücke ich Herrn Dr. med. H. Lührs und Herrn Dr. med. T. Menzel meinen Dank aus, ebenso Herrn Dr. med. F. Boxberger für die Vorarbeiten an den Biopsien der Colitis ulcerosa-Patienten.

Ein spezielles Dankeschön gebührt auch den Mitarbeiterinnen des Gastrolabors Frau K. Backhaus, Frau E. Kelber und Frau D. Kuhn für die sehr gute Zusammenarbeit. Bei Frau G. Dusel bedanke ich mich für die hervorragende Anleitung beim Erlernen der immunhistologischen Färbetechniken sowie die überaus hilfreichen Ratschläge und sehr innovativen Diskussionen.

Meine besondere Dankbarkeit gilt meinen Eltern für die finanzielle und moralische Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Ohne sie wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form sicherlich nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Tobias Gerke
geb. am 11. Juli 1972 in Minden (Westf.)
ledig

Bildungsweg

09/1983 – 06/1992 Gymnasium Porta Westfalica, Abitur
10/1994 – 09/2001 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/1997 Ärztliche Vorprüfung
08/1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2001 – 11/2002 Praktisches Jahr an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster: Innere Medizin, Chirurgie und Wahlfach Anästhesie im Klinikum Minden
11/2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

01/2003 – 09/2003 Arzt im Praktikum, Med. Klinik I, Universitätsklinikum Lübeck, Direktor Prof. Dr. med. H.-L. Fehm
seit 01/2004 Arzt im Praktikum, Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Klinikum Kreis Herford, Chefarzt Prof. Dr. med. P. Reinhold

Promotion

03/1999 – 03/2003 Experimentelle Arbeit zum Thema „Inhibition des nukleären Transkriptionsfaktors kappa B (NF- κ B) durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat“, Gastroenterologischer Schwerpunkt der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, Prof. Dr. med. W. Scheppach

Zivildienst

10/1992 – 12/1993 Johanniter Unfallhilfe e. V. Bad Oeynhausen, Ausbildung zum Rettungssanitäter

Praktische Tätigkeiten

- 01/1994 – 03/1998 regelmäßige ehrenamtliche Einsätze als Rettungssanitäter, Johanniter Unfallhilfe e. V., Bad Oeynhausen
- 01/1994 – 04/1999 Aushilfe im Pflegedienst, Krankenhaus Bad Oeynhausen
- 05/1996 – 07/2001 Aushilfe im Pflegedienst auf der Intensivstation der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg
- 03/2000 – 07/2000 Betreuung eines Projektes der norwegischen Firma EWICUM zur computergestützten Früherkennung kritischer Zustände des Intensivpatienten an der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg