

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

**EXPRESSION UND REGULATION DES ANTIMIKROBIELLEN  
CATELICIDIN-PEPTIDS LL-37 IN HUMANEN  
KOLONEPITHELZELLEN, MONOZYTEN UND PBMC**

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

Konrad Iffland  
aus Ulm

Würzburg, Mai 2004

Referent: Professor Dr. med. Wolfgang Scheppach

Korreferent: Professor Dr. med. Heinz-Jochen Gassel

Dekan: Professor Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2004

Der Promovend ist Arzt.

*MEINEN ELTERN*

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Antimikrobielle Peptide	1
1.2 Gastrointestinaltrakt und antimikrobielle Peptide	6
1.3 Darmflora und Butyrat	7
1.4 Ziel der vorliegenden Untersuchungen	9
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Material	11
2.1.1 Zellen und Zellkulturexperimente	11
2.1.2 Analyse der Zellsignalwege	12
2.1.3 Primärkulturen von normalen Epithel- und kolorektalen Karzinomzellen	12
2.2 Analysemethoden	13
2.2.1 RNA Extraktion	13
2.2.2 RNA Aufreinigung und die RNase-free DNase Behandlung	14
2.2.3 cDNA-Synthese	15
2.2.4 Semiquantitative RT-PCR	15
2.2.5 Southern Blot	17
2.2.6 Hybridisierung	17
2.2.7 Real-Time RT-PCR	18
2.2.8 Western Blot	21
2.2.8.1 Protein Aufbereitung für LL-37 Western-Blot	21
2.2.8.2 Proteinkonzentrationsmessung	23
2.2.8.3 Western-Protokoll LL-37	23
2.2.8.4 Elektrophorese	24
2.2.8.5 Blotting	24
2.2.8.6 Färbung	25
2.2.9 Immunhistochemie	25
2.2.10 Theoretischer Hintergrund der Apoptosebestimmung durch eine Annexin V–Propidiumjodid–Doppelfärbung	27
2.2.11 FACS-Analyse	30
2.2.12 Differenzierungsuntersuchung	31
2.3 Statistische Analysen	32

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1 Butyrat induziert sowohl die LL-37 Expression in Kolonepithelzellen als auch die AP Aktivität, als Marker für Kolonzell-differenzierung.	33
3.2 Die Induktion der Differenzierung geht mit der Induktion einer LL-37 Transkription in Kolonepithelzellen einher.	39
3.3 Die LL-37 Induktion geht nicht mit einer Apoptose-induktion in den Kolonepithelzellen einher.	42
3.4 Eine Zytokinstimulation mit oder ohne Butyratvorbehandlung hat keinen Einfluss auf die LL-37 Expression in Kolonozyten.	45
3.5 Induktion der LL-37 Expression durch Butyrat in Primärkulturen kolorektaler Tumoren.	47
3.6 Differenzierte Epithelzellen der Darmschleimhaut in Kolon und Ileum exprimieren LL-37.	48
3.7 Butyrat und Trichostatin A induzieren Differenzierung und LL-37 mRNA Expression in Kolonepithelzellen über eine Modulation intrazellulärer Signalwege.	49
3.8 Die Butyrat-regulierte Expression von LL-37 in PBMC und U937 Monozyten.	53
3.9 LL-37 lässt sich im WESTERN Blot nicht nachweisen.	55
<b>4. Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1 Antimikrobielle Peptide	56
4.2 Proliferation, Differenzierung und Apoptose	56
4.3 Immunhistochemische Färbungen	58
4.4 Effekte auf die LL-37 Expression	58
4.5 Signalwege	60
4.6 LL-37 Expression in Monozyten	61
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>Danksagung</b>	
<b>Curriculum vitae</b>	

## **1. Einleitung**

### **1.1 Antimikrobielle Peptide**

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind kleine Moleküle mit weniger als 100 Aminosäuren, die von Zellen in Insekten, Pflanzen, Bakterien, Vertebraten, wirbellosen Tieren und ebenso von humanen Zellen synthetisiert werden (1-3). AMP gehören zur Gruppe der endogenen Antibiotika (2). Im Rahmen der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr spielen sie innerhalb der Barrierefunktion des intakten Epithels des Respirations-, Urogenital- und Gastrointestinaltraktes und der Haut eine wichtige Rolle bei der Abwehr infektiöser Erreger. Zusätzlich können AMP, neben ihrer ursprünglichen direkten Abwehrfunktion, auch Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren (4, 5). Antimikrobielle Peptide sind in ihrer Funktion als mikrobizide Substanzen und als Entzündungsmediatoren insbesondere an der initialen Bekämpfung und Eliminierung pathogener Keime und der gleichzeitigen Aktivierung des adaptiven Immunsystems beteiligt (4, 5). Sie können deshalb als Effektorsubstanzen des angeborenen Immunsystems bezeichnet werden.

Ihr antimikrobielles Spektrum ist weit und umfasst gram-negative und -positive Bakterien, Pilze und lipidumhüllte Viren (6, 7). Sie zeigen einen teils additiven und synergistischen Effekt mit anderen wirtsspezifischen Abwehrmolekülen wie Lysozym und Laktoferrin (8). Allen antimikrobiellen Peptiden sind zwei Eigenschaften gemein: Zum einen haben sie bei neutralem pH eine positive Nettoladung, zum anderen weist ihre dreidimensionale Struktur sowohl eine hydrophobe als auch eine hydrophile Seite auf (9). Diese Struktureigenschaften sind für ihre Wirkungsweise wichtig: AMP gehen mit negativen Ladungen auf Oberflächen von Mikroorganismen, insbesondere Lipopolysacchariden, Interaktionen ein. Diese wiederum kommen gehäuft bei Mikroorganismen vor als bei eukaryonten Zellen. Danach kommt es zu Wechselwirkungen mit der Membran (10, 11). Durch ihren amphipatischen Charakter können sich antimikrobielle Peptide in Membranen einlagern und in Komplexen mit mehreren Peptiden Kanäle in der Membran bilden. Der folgende Zusammenbruch des Membranpotentials führt schließlich zur Lyse der betroffenen Zelle. Es sind auch andere Wirkungsweisen bekannt, die zum Teil auch spezifische Interaktionen mit

Rezeptormolekülen oder intrazellulären Molekülen beinhalten (12, 13). Die antimikrobielle Aktivität der AMP gegen multiresistente Mikroorganismen liegt mit 1-8µg/ml in vitro im Rahmen derer konventioneller synthetischer Antibiotika. Durch oben erwähnte mikrobizide Mechanismen sind Resistenzentwicklungen selten. Sie umfassen Veränderungen von Effluxpumpensysteme (14) oder Modifikationen von Oberflächenbestandteilen der äußeren Hülle von Mikroorganismen (15). Neben vorhin genannten Gemeinsamkeiten und Charakteristika unterscheiden sich AMP der verschiedenen Gruppen in ihrer Größe, ihrer Aminosäuresequenz und bestimmten strukturellen Eigenschaften.

Außerdem sind alle AMP von Eukaryonten genkodiert; das heißt ein Gen kodiert ein Peptid, und sie weisen eine charakteristische Intron-Exon-Struktur mit Regulationselementen in ihrer Promoterregion auf (16, 17) (Abbildung 1). Genfamilien strukturell ähnlicher Moleküle finden sich in Genomen oft in Clustern angeordnet und bilden sich auf abgestimmten chromosomalen Regionen in unterschiedlichen Säugetierspezies ab, was einen Hinweis über die evolutionäre Entwicklung dieses angeborenen Immunsystems gibt. Das primäre Translationsprodukt ist ein Präpropeptid, dessen N-terminales Targetingpeptid beim Eintritt in das endoplasmatische Retikulum abgespalten wird (Abbildung 1). Das Prosegment hat unterschiedliche biologische Funktionen; unter anderem inhibiert es die Aktivität des eigentlichen Peptids durch ladungsabhängige Interaktionen. Das C-terminalen kationischen Peptid besitzt meistens die antimikrobielle Aktivität (8) (Abbildung 1). Antimikrobielle Peptide werden in Zellen oft als Propeptide oder nach Abspaltung des Propetids als reifes C-terminales Peptid gespeichert (8).

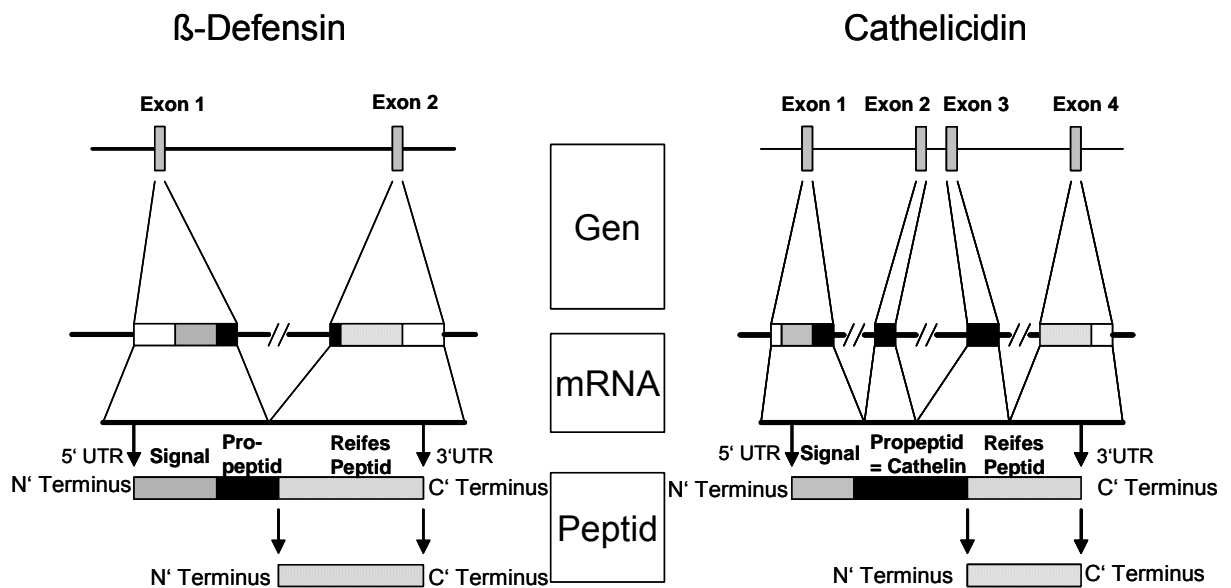


Abbildung 1: Vom Gen zum fertigen Peptid. Die Gemeinsamkeiten der antimikrobiellen Peptide anhand der  $\beta$ -Defensine und der Cathelicidine.

Seit der Erstbeschreibung eines antimikrobiellen Peptids konnte eine steigende Anzahl AMP beim Menschen und bei Säugetieren charakterisiert werden. Allen diesen Peptiden ist gemeinsam, dass sie in Vesikeln von Granulozyten gespeichert und bei Bedarf durch bestimmte Stimuli aktiviert oder durch Epithelzellen direkt auf Oberflächen sezerniert werden.

Die zwei Hauptfamilien der antimikrobiellen Peptide der Säugetiere stellen Defensine und Cathelicidine dar. Diese sind auf Basis von strukturellen homologen Motiven, die die Beziehungen zwischen den einzelnen Familienmitgliedern widerspiegeln, zugeordnet worden. Beim Menschen sind bislang zehn Defensine beschrieben worden: sechs  $\alpha$ -Defensine (HNP1-4, HD5-6) und vier  $\beta$ -Defensine (HBD1-4) (18). Die  $\alpha$ -Defensine HNP1-4 werden von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet, während  $\alpha$ -Defensine HD5-6 und  $\beta$ -Defensine von Keratinozyten der Haut, Plattenepithelzellen der Zunge und Ösophagus und von Immunzellen produziert werden (18).

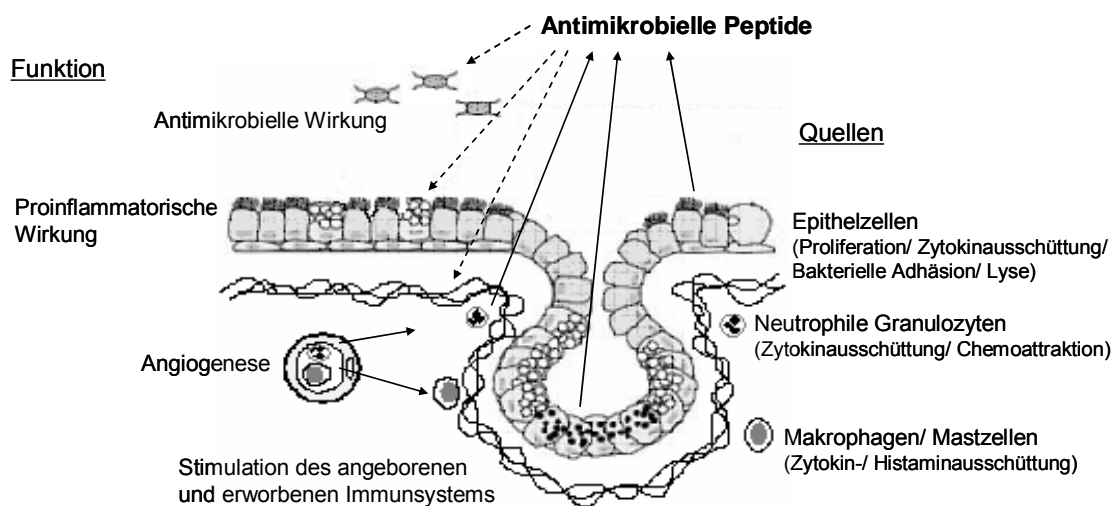
Daneben umfassen die Cathelicidine eine Familie von antimikrobiellen Vorläuferpeptiden mit einer gut konservierten Cathelin Pro-Region und einer variablen C-terminalen antimikrobiellen Domäne. hCAP-18 ist das einzige humane Cathelicidin



(mit 140 Aminosäuren), welches nach Prozessierung zwischen Ala103 und Leu104 zum aktiven, antimikrobiellen Peptid LL-37 (mit 37 Aminosäuren) führt (19-21).

Zusätzlich ist das humane Gen für LL-37 kloniert worden, das inzwischen als CAMP-Gen (cathelicidin antimicrobial peptide) bezeichnet wird (3). LL-37/ hCAP-18 kommt in den Granula von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten vor (20, 22). Darüber hinaus wird es vom Knochenmark (19), im Hoden (19), von Keratinozyten entzündeter Hautabschnitte (23), Lungenepithel (24) und dem Plattenepithel der menschlichen Mundhöhle, der Zunge, der Speiseröhre, der Gebärmutter und der Vagina gebildet (25). Auf mRNA Ebene und für das aktive Peptid wurde die LL-37-Expression durch Kolonepithelzellen beschrieben (26). Sowohl gereinigtes als auch synthetisiertes LL-37 Peptid weist eine miteinander vergleichbare antimikrobielle Aktivität in vitro auf (3, 27). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass auch die Cathelicidin Prosequenz – das Cathelin – antimikrobiell wirkt und zusätzlich eine Proteinaseaktivität inhibiert (28).

Neben ihrer direkten Wirkung auf Bakterien sind AMP auch an der Verzahnung von angeborener und erworbener Immunantwort beteiligt (Abbildung 2). LL-37, und auch die Defensine, wirken chemotaktisch auf dendritische Zellen, T-Zellen und Phagozyten (18). Inzwischen sind auch die Rezeptoren identifiziert worden, welche die chemotaktischen Effekte der Peptide vermitteln (18) (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Übersicht über die wichtigsten Effekte antimikrobieller Peptide. Neben Ihrer antimikrobiellen Funktion spielen sie noch eine wichtige Rolle bei Entzündungen und Infektionen. AMPs kommen in Epithelzellen und Entzündungszellen vor. Defensine und LL-37 haben eine Feedback Mediatorfunktion zwischen diesen beiden Zelltypen; sie beeinflussen die

Ausschüttung verschiedener Mediatorssubstanzen oder andere Prozesse wie zum Beispiel Proliferation und Chemoattraktion.  
Modifiziert nach Current Science Ltd.

Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung scheint LL-37 auch an der Reepithelialisierung von Hautwunden beteiligt zu sein (29). Weitere Funktionen der AMP sind zu erwarten; kürzlich konnte auch ein Effekt von LL-37 auf die Angiogenese beobachtet werden (30).

Die Bedeutung antimikrobieller Peptide wird ersichtlich, wenn ein Mangel an AMP herrscht. Inzwischen sind Erkrankungen bekannt, in deren Pathogenese AMP eine entscheidende Rolle spielen. So konnte in vivo anhand eines Mausmodells erstmals gezeigt werden, dass die endogene Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37, beziehungsweise des entsprechenden CRAMP Peptids der Maus, die Abwehr gegen eine invasive bakterielle Invasion unterstützt (31). So waren CRAMP-negative Knock-out Mäuse gegenüber Hautinfekten durch Streptokokken der Gruppe A viel anfälliger (31). Außerdem veränderte eine induzierte bakterielle Resistenz gegenüber Cathelicidinen den Krankheitsausbruch in der gleichen Weise wie die Elimination der Cathelicidinproduktion des Wirts (31). Zusammenfassend legen diese beiden Ergebnisse nahe, dass die antimikrobielle Aktivität der Cathelicidine für das angeborene Immunsystem der Haut von entscheidender Bedeutung ist.

Bei bestimmten AMP, wie auch bei LL-37, hängt die antimikrobielle Aktivität von der räumlichen Konformation des Peptids und diese vom Salzgehalt des umgebenden Milieus ab (27). Es konnte gezeigt werden, dass die hohe Infektanfälligkeit von Patienten mit zystischer Fibrose mit dem hohen Salzgehalt des Lungensekrets und der nachfolgenden Inaktivierung von Defensinen in der Lungenflüssigkeit zusammenhängt (32). Im Lungenepithel eines Xenograftmodells der zystischen Fibrose konnte die Überexpression des Cathelicidin-Peptids LL-37, das unter gleichen Bedingungen nicht inaktiviert wird, diesen Abwehrdefekt überwinden und die antibakterielle Aktivität des Lungenepithelsekrets wiederherstellen (33).

Patienten mit Morbus Kostmann, einer kongenitalen Leukopenie, fehlt LL-37 in den neutrophilen Granulozyten. Zusätzlich sind auch die  $\alpha$ -Defensine HNP 1-3 in diesen Zellen vermindert nachweisbar. Auch im Plasma und in Saliva dieser Patienten kann kein LL-37 nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass ein Defekt der AMP

Expression in der angeborenen Immunabwehr die bei Morbus Kostmann rezidivierend auftretenden Schleimhautinfekte mit bedingt (34).

Es ist bekannt, dass die atopische Dermatitis mit Hautinfektionen, wie mit *Staphylococcus aureus*, in den betroffenen Hautarealen assoziiert ist. In diesen Hautläsionen konnte kein LL-37 und kein HBD-2 nachgewiesen werden oder die Menge dieser antimikrobieller Peptide war signifikant verringert. Deshalb kann ein Mangel der Expression von AMP die Anfälligkeit von Patienten mit atopischer Dermatitis für Hautinfektionen erklären (35).

## **1.2 Gastrointestinaltrakt und antimikrobielle Peptide**

Insbesondere im Gastrointestinaltrakt, wo ein direkter Kontakt der Schleimhaut mit der Bakterienflora eine ständige Abwehr potentiell infektiöser Erreger erfordert, spielen antibakterielle Peptide eine wichtige Rolle: Die einzellige Schicht des Schleimhautepithels bildet eine aktive wirkungsvolle physikalische Barriere gegen das Kolonlumen und insbesondere gegen die intestinale Bakterienflora. Dazu zählt, dass das humane Epithel eine Vielzahl unterschiedlicher Effektormoleküle – darunter auch die antimikrobiellen Peptide – produzieren kann (36, 37). Die Epithelzellen exprimieren und sezernieren die  $\alpha$ -Defensine HD5-6 und das humane  $\beta$ -Defensin 1 und tragen damit zur unspezifischen Immunabwehr bei (38). Es ist wahrscheinlich, dass antimikrobielle Peptide aktive Effektormoleküle bei der intestinalen mucosalen Verteidigung sind, weil sie ein integraler Teil der unmittelbaren Antwort auf einen etwaigen Durchbruch der Schleimhautbarriere und die anschließende Invasion von Krankheitserregern sind.

In diesem Zusammenhang ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die Expression der Defensine HD-5 und HD-6 in der Kolonschleimhaut erhöht (39). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Normalflora die Sekretion der Defensine stimuliert (40). Es kommt in den Epithelzellen des Kolons zur Induktion von humanem  $\beta$ -Defensin 2, nicht jedoch des humanen  $\beta$ -Defensin-1, wenn diese mit verschiedenen Interleukinen und pathogenen Darmbakterien oder *Helicobacter pylori* in vivo und in vitro stimuliert werden (38, 41). Um die Bedeutung der Defensine in der Schleimhautbarriere zu verdeutlichen, konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem Defekt in der Prozessierung der Defensine im Darm empfänglicher für eine Infektion

oral verabreichter Pathogene – wie etwa *S. typhimurium* – sind (42). Daneben überleben transgene Mäuse, die zusätzlich humanes Defensin in den Panethzellen exprimieren, deutlich länger nach einer Infektion mit *S. typhimurium* (43) als unbehandelte.

Verschiedene Signalwege wurden kürzlich als Ansatzpunkte für virale und bakterielle Pathogene postuliert (44, 45). Das detaillierte Verständnis von Vorkommen, Wirkung und der Regulation dieser Moleküle im angeborenen Immunsystem kann in der Zukunft vielleicht zu effizienten Behandlungsmethoden führen (23, 38, 46).

Die Expression von LL-37 in humanen Kolonzellen wurde inzwischen ebenfalls auf RNA-Ebene (24) und für das aktive Peptid beschrieben (26). Aber weitere Regulationsmechanismen der LL-37 Expression in Kolonozyten sind nicht bekannt. Bislang ist unter anderem auch nicht geklärt, ob und welche Entzündungsmediatoren auf die Expression von LL-37 einen Einfluss haben. Weiterhin ist nicht geklärt, ob und welche pathogenen Erreger und welche Keime der Normalflora die Expression von LL-37 in humanen Kolonepithelzellen beeinflussen. Einzig Islam et al. konnten in aktuellen Forschungsergebnissen zeigen, dass LL-37 und  $\alpha$ -Defensine für die Abwehr einer Shigelleninfektion in der Kolonschleimhaut essentiell sind (26). Shigella-Bakterien haben Mechanismen entwickelt die antimikrobielle Peptidbarriere im menschlichen Dickdarm zu umgehen: Es gelingt ihnen erst nach einer Herabregulation von LL-37 und HBD-1, die durch freigesetzte bakterielle Plasmid-DNA vermittelt wird, in die Schleimhaut einzudringen und das typische Krankheitsbild auszulösen (26).

Zusammenfassend verdeutlichen diese Resultate die Wichtigkeit dieser Peptide in der Barrierefunktion des Epithels des gastrointestinalen Trakts und für die Abwehr bakterieller Infekte.

### **1.3 Darmflora und Butyrat**

Als Folge von veränderter Ernährung, medizinischer Behandlung oder gastrointestinalen Erkrankungen kann es zu Veränderungen der Kolonepithelbarriere kommen. Ein Mangel an Ballaststoffen kann eine Translokation von Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt erleichtern (47). Das Gleichgewicht zwischen Bakterienflora, durch Bakterien produzierte Stoffwechselprodukte von Nahrungsbestandteilen, sowie der Reaktion der Schleimhaut auf die bakterielle Besiedelung ist demnach für den

störungsfreien Ablauf der physiologischen Darmfunktionen von entscheidender Bedeutung.

Einen essentiellen Bestandteil der Ballaststoffe stellen diejenigen Kohlenhydrate dar, die von den Enzymen des menschlichen Darmes nicht verdaut werden können und so ins Kolon gelangen. Dort sind anaerobe Bakterien in der Lage, diese Kohlenhydrate zu fermentieren. Zu den Produkten dieser Fermentation gehören unter anderem die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat mit einer Mindestmenge von 300mMol pro Tag in einem Verhältnis 57% zu 22% zu 21% (48).

Besondere Bedeutung hat das Butyrat, das von den Kolonozyten aufgenommen und, gegenüber Glucose und Glutamat bevorzugt, von der Zelle als Energielieferant verstoffwechselt wird (49). Darüber hinaus üben Butyrat und andere kurzkettige Fettsäuren tief greifende Effekte auf die Physiologie des Kolonepithels aus, weil sie die Flüssigkeitsabsorption, die Kolonozytenproliferation und -differenzierung, die Beweglichkeit des gastrointestinalen Traktes und Entzündungsvorgänge in der Mucosa beeinflussen (50, 51). Aus einem Mangel an Butyrat resultieren Mucosaatrophie und nachfolgende Entzündung der Schleimhaut, nicht unähnlich einer Colitis ulcerosa (52, 53). Folge einer Entzündung, vor allem einer chronischen Entzündung, kann die Ausbildung von Dysplasien sein. Kommt es zur Ausbildung von Dysplasien, steigt das Risiko der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (54). In normaler Mucosa sorgt Butyrat für Wachstum und Überleben der Kolonozyten (55, 56). Während Butyrat auf normale Kolonozyten proliferationsfördernd wirkt, bewirkt es in neoplastisch veränderten Epithelzellen eine Reduktion des Wachstums und hemmt die präneoplastische Hyperproliferation in vitro, die durch verschiedene Tumorpromotoren induziert wird (57, 58).

Werden verschiedene Karzinomzelllinien des Kolons mit Butyrat in physiologischen Konzentrationen in vitro inkubiert, kommt es zu einer Inhibition der Proliferation und einer Steigerung der Differenzierung in der Zellpopulation (59-61). Ein weiterer Effekt von Butyrat ist, neben einer Modulation der Adhäsionsmoleküle (62), die Induktion von Apoptose (62, 63), wobei die Differenzierung der Apoptoseinduktion offenbar vorausgeht (64-68). Die Relevanz dieser mit der Tumorgenese verknüpften Effekte wird sowohl durch Tiermodelle (69, 70) verdeutlicht, als auch durch Untersuchungen an

Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen, deren fäkale Butyratspiegel deutlich vermindert waren (71).

Die unterschiedlichen hier dargestellten Aspekte von Butyrat werden unter dem Begriff Butyrat-Paradoxon (72) zusammengefasst: Hauptenergieträger und Wachstumsstimulator normaler Kolonschleimhaut auf der einen Seite, Proliferationshemmer und Förderer von Apoptose und Differenzierung kolorektaler Karzinomzellen in vitro auf der anderen. Damit ist Butyrat durchaus als ein Inhibitor kolorektaler Karzinogenese anzusehen (73).

Auf welchen molekularen Grundlagen diese paradoxen Effekte von Butyrat beruhen, ist bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Ansatzpunkte sind Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 (74-76), Aktivierung und Inaktivierung verschiedener stressaktivierter Kinasen wie p38, JNK oder ERK (77).

Zusätzlich hat Butyrat einen direkten Einfluss auf Immunzellen. Werden humane mononukleäre Zellen im peripheren Blut (PBMC) oder Monozyten mit Butyrat behandelt, so reduziert sich deren Fähigkeit T-Zell Antworten zu stimulieren. Monozyten und PBMC exprimieren konstitutiv LL-37, das zusätzlich zur antimikrobiellen Aktivität chemotaktisch auf polymorphkernige Leukozyten und T-Lymphozyten wirkt (22).

Ob kurzkettige Fettsäuren oder andere luminalen Substanzen innerhalb des Kolons die Expression antimikrobieller Peptide in Kolonepithelzellen und Immunzellen verändern können, ist bis dato unbekannt. Erst kürzlich wurde darüber berichtet, dass kleine Moleküle, einschließlich Aminosäuren, die epitheliale  $\beta$ -Defensin-Expression induzieren können, und dass Retinolsäure die Expression eines antibakteriellen Gens der Cathelicidine bei Schweinen induziert (78, 79). Es ist aber wenig bekannt über die Bedeutung der luminalen Darmfaktoren und Entzündungsmediatoren in Bezug auf die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in Kolonepithelzellen.

#### **1.4 Ziel der vorliegenden Untersuchungen**

Butyrat beeinflusst viele Vorgänge, darunter Wachstum und Differenzierung, in verschiedenen Zellen innerhalb des Magen-Darm-Traktes. Die Ziele der vorliegenden Dissertation waren deshalb Untersuchungen anhand verschiedener Zelllinien – wie

Kolonzellen und Immunzellen (Monozyten und PBMC) – ob Butyrat und einige ausgewählte luminaire Darmfaktoren einen Einfluss auf die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 haben. Weiterhin sollte untersucht werden, ob verschiedene Entzündungsmediatoren und eine Kombination dieser mit Butyrat eine Wirkung auf die untersuchten Zellen ausüben kann. Zusätzlich stellte die Charakterisierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, die an der Regulation von LL-37 in diesen Zellen beteiligt sind, ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zellen und Zellkulturexperimente**

Die humanen Kolonepithelzelllinien SW620 (ATCC CCL-227), SW480 (ATCC CCL-228) und HT-29 (ATCC HTB-38) wurden für diese Arbeit benutzt. Sowohl SW620 als auch SW480 wurden in Dulbeccos minimal essential medium (MEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg Streptomycin (LifeTechnologies, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. HT-29 Zellen wurden in RPMI Medium (Life Technologies) kultiviert, dem 5% FBS und 2mM L-Glutamin zugesetzt war. Zudem wurde eine bislang noch nicht veröffentlichte Kolonzelllinie Geki2 verwendet, die in unserem Labor aus einem Kolonadenom einer 56 Jahre alten Frau etabliert wurde. Diese Zelllinie wurde in DMEM (LifeTechnologies) kultiviert, das 10% FBS enthielt. Alle Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. 1\*10<sup>6</sup> Zellen pro jeweiliger Zelllinie und Flasche wurden ausgesät und so lange kultiviert bis annähernd 60-70% Konfluenz vor der Weiterbehandlung erreicht wurde. Azetat (5mM), Propionat (10mM), Butyrat (0,5mM, 1mM, 2mM, 4mM), Iso-Butyrat (0,2mM, 2mM), Laktat (0,2mM, 2mM), Flavon (25-150µM), Camptothecin (100nM) (alle: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) oder Trichostatin A (400ng/ml) (Calbiochem, CA, USA) wurden dem serumfreien Medium hiernach zugefügt und die Zellen bis zu 72 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden Zellen mit TNF $\alpha$  (20ng/ml) oder mit IL-1 $\alpha$  (20ng/ml), IL-6 (20ng/ml), IFN- $\gamma$  (40ng/ml) (alle: Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), IFN- $\alpha$  (10000 U/ml), PMA (20µg/ml) (beide: Serotec, Oslo, Norwegen), LPS (10µg/ml) (Sigma) oder der Mediumkontrolle bis zu 6 Stunden stimuliert. In weiteren Experimenten wurden mit Butyrat (4mM, 24 Stunden) vorbehandelte SW620 Zellen noch mit TNF $\alpha$  (0-60 Minuten) stimuliert.

Buffy Coats von gesunden Blutspendern wurden durch das Karolinska Hospital, Stockholm, Schweden, gewonnen und mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) durch Ficoll-Hypaque Gradientenzentrifugation (Pharmazia, Uppsala, Schweden) isoliert. PBMC und U937, eine monozytäre Zelllinie (ACC5, DSMZ



Braunschweig, Deutschland), wurden in RPMI Medium, das mit 10% FBS angereichert war, kultiviert und anschließend mit Butyrat (2mM) oder Trichostatin A (400ng/ml) bis zu 48 Stunden behandelt.

### **2.1.2 Analyse der Zellsignalwege**

Um die Rolle der verschiedenen Signalwege auf die Butyrat induzierte Differenzierung und Induktion der LL-37 Transkription zu untersuchen, wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden SW620 und HT-29 Kolonzellen mit oder ohne den spezifischen MEK 1 Inhibitor UO126 (20 µM) (Cell Signaling, MA, USA) für bis zu 30 Minuten inkubiert, und zwar bevor dem Zellkulturmedium Butyrat (2mM) oder Trichostatin A (400ng/ml) zugegeben wurde und diese dann bis zu 48 Stunden inkubiert wurden. Weiterhin wurden SW620 Kolonepithelzellen 30 Minuten vor einer Butyratbehandlung mit dem p38/MAP-Kinase Inhibitor SB203580 (10µM) (Calbiochem, CA, USA) oder einer Negativkontrolle inkubiert. Zudem wurden die monozytäre Zellen PBMC und U937 vor Butyratzugabe mit dem MEK 1 Inhibitor UO126 vorbehandelt.

### **2.1.3 Primärkulturen von normalen Epithel- und kolorektalen Karzinomzellen**

Gewebeproben sowohl von Karzinomläsionen als auch von normaler Mucosa außerhalb der Tumorgrenzlinie wurde von Patienten gewonnen, die sich einer chirurgischen Behandlung wegen primärem Adenokarzinom des Kolons in der Chirurgie, Universität Würzburg, unterziehen mussten. Das Material des Kolongewebes wurde spätestens zwei Stunden nach dem Eingriff verarbeitet. Das Gewebe wurde in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) gewaschen, dem Streptomycin (250pg/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Penicillin (200IU), Gentamycin (125pg/ml), Fungizone (0,6µg/ml) und Glutamin (0,58mg/ml) (alle: Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) zugefügt wurde. Dann wurde die lamina muscularis mucosae mit einem Skalpell herausgeschnitten. Kleine Anteile des Tumors und der normaler Mucosa wurden in PBS gewaschen, zentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert und mit Kollagenase I (2mg/ml) (Sigma) behandelt. Die daraus entstandene Zellsuspension

wurde filtriert (100µm Filter, Falcon, Heidelberg, Deutschland) und wieder in Kulturmedium überführt. Ein diskontinuierlicher Zentrifugationsschritt mittels Percoll Gradienten wurde durchgeführt, bei der eine Mischung benutzt wurde, die 9 Teile Percoll (Pharmacia, NJ, USA), einen Teil Hank's Solution (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 0,4 Teile einer 0,1 M NaOH-Lösung (Sigma) enthielt. Isolierte Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert, gewaschen, bei 10g 15 Minuten zentrifugiert und in das endgültige Kulturmedium (DMEM mit 10% FBS, EGF (1nM/ml) (Promega, Mannheim, Deutschland), TGFα (200µg/ml) (Gibco), Gentamycin (125pg/ml), Penicillin (200U/ml), Streptomycin (200pg/ml), essentielle Aminosäuren (1%), Fungizone (6,6µg/ml), MITO plus Serum-Expander (1ml/L) (alles von Collaborative Biomedicals, Bedford, MA, USA)) überführt.  $1 \cdot 10^6$  Zellen wurden in eine 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit dem endgültigen Zellkulturmedium ausgesät. Für die Charakterisierung der isolierten normalen und der Karzinomepithelzellen wurden Zellen auf Chamber Slides kultiviert und mit einem spezifischen Antikörper (35βH11, Dako Diagnostics, Hamburg, Deutschland) auf Zytokeratinexpression gefärbt. Nur Kulturen, die >90% positiv für Zytokeratin gefärbt waren, wurden weitergeführt. Die Zellen wurden routinemäßig auf deren Vitalität mit Trypanblauausschluss geprüft und ausschließlich Kulturen mit einer größeren Vitalität als 90% wurden verwendet. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Zellkulturmedium ersetzt, welches dann entweder Butyrat mit einer Konzentration von 2mM oder Kontrollmedium enthielt. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und wie unten beschrieben verarbeitet. Alle Arbeiten an humanem Material wurden durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt.

## **2.2 Analysemethoden**

### **2.2.1 RNA Extraktion**

Zu jedem Messzeitpunkt wurde die gesamte RNA aus der adhärent wachsenden Zellfraktion mittels Trifast® (Peqlab, Erlangen, Deutschland) extrahiert. Dazu wurde Trifast auf die Zellen gegeben (4ml pro 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche) und nach kurzer Einwirkzeit noch adhärente Zellen zusätzlich mit einem Zellschaber gelöst. Das

entstehende Zellsuspensat wurde dann in entsprechend gekennzeichnete 1,2ml Eppendorfgefäße überführt. Hiernach wurde 200µl Chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) pro Gefäß zugegeben und kräftig geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Einwirkzeit wurden die Eppendorfgefäße bei 13000U/min (16060g) und RT 5 Minuten lang zentrifugiert; dabei kam es zur Phasentrennung. Die obere, farblose wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,2ml fassendes Eppendorfgefäß überführt. Die erwünschte RNA-Präzipitation geschah durch Zugabe von 0,5ml Isopropanol (Sigma), wobei die Lösung gevortext und 15 Minuten bei RT inkubiert wurde. Eine Zentrifugation für 10 Minuten folgte bei 13000U/min und 4°C, der Isopropanolüberstand wurde abgegossen und das erhaltene Pellet zum Waschen je zweimal mit 1ml 75% Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Holland) gevortext und jeweils 10 Minuten bei 13000U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet kurz an der Luft getrocknet und in 100µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.2.2 RNA Aufreinigung und die RNase-free DNase Behandlung**

Für die RNA Aufreinigung und die DNase Behandlung wurde ein kommerzielles Kit (RNeasy, Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Zu den 100µl RNA-Lösung wurden 350µl RLT Puffer (RNeasy, Qiagen), der zuvor mit 10µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) pro ml Puffer aktiviert worden war, zugegeben und gemischt. Hierzu wurden 250µl 100% Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Holland) gegeben. Die entstandene Lösung wurde durch Pipettieren gemischt, aber nicht gevortext. Das gesamte Volumen, 700µl, wurde auf eine RNeasy-Säule (Qiagen) gegeben und eine Minute bei 13000U/min und 4°C zentrifugiert und das Eluat verworfen. Hiernach wurde mit 350µl Puffer RW1 (RNeasy, Qiagen) mittels einminütiger Zentrifugation bei 13000U/min die Säule ausgewaschen um ungebundene Bestandteile zu entfernen. Gleichzeitig wurde die DNase Behandlung vorbereitet: Es wurde pro Probenanzahl 10µl DNase Stammlösung (RNase-free DNase Set, Qiagen) zu 70µl RDD Puffer (Qiagen) gegeben und vorsichtig gemischt. Der erhaltene DNase Mix (80µl) wurde auf die Fritte der Kolonne getropft und für ca. 30 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde nochmals mit 350µl RW1 Puffer (Qiagen) gewaschen und eine Minute bei 13000U/min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Zwei

Waschvorgänge mit 500µl RPE Puffer (RNeasy, Qiagen), der zuvor mit 100% Ethanol (J.T. Baker) aktiviert worden war, und nachfolgende Zentrifugation für eine Minute bei 13000U/min schlossen sich an. Jetzt wurde die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorf Gefäß gesetzt, 30µl RNase-freies Wasser zupipettiert und mindestens eine Minute bei 13000U/min zentrifugiert. Die gereinigte RNA wurde in diesen 30µl gelöst.

### **2.2.3 cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurden 10µl jeder RNA-Isolierung (Template) bei 94°C für 5 Minuten in einem GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems, USA) denaturiert. Gleichzeitig wurde der benötigte Reaktionsmix vorbereitet, wobei das Verhältnis zwischen Template und Reaktionsmix immer 1:1 war. Letzterer bestand aus 4µl 5x First Strand Buffer, 1,5µl 0,1M DTT, 1µl Reverse Transcriptase (RT) bei 200U/µl (M-MLV-RT Set, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, USA), 2µl 2,5µM dNTP (Gibco), 0,5µl (40U/µl) rekombinantes Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA) und 1µl (0,05µg/µl) N<sub>6</sub> Random hexamer primer (Promega). Bei jeder cDNA-Synthese wurde eine interne Negativkontrolle mitgeführt, bestehend aus 10µl Wasser anstelle des RNA-Templates. Im GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems) wurden die Proben 40 Minuten bei 40°C erwärmt, gefolgt von einem anschließenden 5-minütigen Temperaturschritt auf 94°C und Abkühlen der Proben auf 4°C. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

### **2.2.4 Semiquantitative RT-PCR**

Eine semiquantitative RT-PCR folgte, wobei eventuelle Expressionsunterschiede des Houskeeping- und des Zielgens, welche durch eine Gelelektrophorese und anschließendes Southern Blotting dargestellt worden waren, dann durch eine Anpassung des Templates in der PCR ausgeglichen wurden. Zuerst wurde der benötigte Reaktionsmix gemischt aus 40µl DNA freiem Wasser, 5µl 10x AdvanTaq Plus® PCR Buffer (BD Biosciences, Clontech, San Jose, CA, USA), 1µl 10mM dNTP (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, USA), jeweils 1µl des Primerpaares (GAPDH (10µM) oder

FAxx („FA“-LL-37) (5 $\mu$ M); beide MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) und 1 $\mu$ l 50X AdvanTaq Plus DNA Polymerase® (BD Biosciences, Clontech). Der Reaktions-Mix wurde in die PCR-Tubes vorgelegt und 1 $\mu$ l cDNA Template hineinpipettiert. Falls zusammengehörige Experimente eine unterschiedliche Menge an DNA pro Probe enthielten, wurde die Amplifikation mit mehr als 1 $\mu$ l Template durchgeführt. Das 50 $\mu$ l Endvolumen wurde hierbei beibehalten; es wurde lediglich die Wassermenge reduziert. Auch hier wurden negative (Wasser) und positive (LL-37) Kontrollen bei jeder PCR durchgeführt. Für eine Amplifikation wurden folgende Bedingungen in dem GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems, USA) eingestellt: 3 Minuten bei 94°C (Hot Start und Denaturierung); pro Zyklus wurden 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 30 Sekunden Annealing bei 60° (GAPDH) oder 62° (LL-37) und eine Minute bei 72°C für die Synthese durchlaufen mit 25 Zyklen für GAPDH und 40 Zyklen für LL-37. Zum Schluss wurde eine 7-minütige Elongation bei 72°C durchlaufen, bevor das Gerät auf 4°C herunterkühlte. Die entstandene DNA wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Die PCR-Reaktion wurde nach Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht kontrolliert. Pro Agarosegel wurde 0,75gr peqGOLD Universal Agarose (Peqlab, Erlangen, Deutschland) abgewogen und mit 50ml 1xTBE gemischt – eine 10X Standardlösung besteht aus 0,9M Tris, 0,9M Borsäure, 20mM EDTA (alle Merck, Darmstadt, Deutschland) in DEPC-Wasser. 40ml 1,5% Agarose wurde mit 1 $\mu$ l Ethidiumbromid (10mg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einem 50ml Falcon Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gemischt und das flüssige Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer (MWG-Biotech AG) mit eingesetzten Kämmen gegossen. Sobald das Gel erkaltet war, wurde die Kammer mit 1xTBE gefüllt und die Kämmen entfernt. Ein homogenes Gemisch aus 1 $\mu$ l DNA 6x loading dye (Promega, Madison, Wisconsin, USA) und 5 $\mu$ l DNA-Probe wurde auf das Agarosegel geladen. Zusätzlich wurde einmal pro Reihe eine DNA-ladder (Promega) (1 $\mu$ l + 1 $\mu$ l loading dye) auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei konstant 90mA für circa 30 Minuten durchgeführt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht beurteilt und eingescannt. Sobald die DNA-Proben des Housekeeping Gens GAPDH gleich ausgeprägt waren, folgte dieselbe Prozedur für das Zielgen LL-37.

### **2.2.5 Southern Blot**

Anschließend wurden die jeweils für GAPDH und LL-37 angeglichenen 1,5% Agarosegele in eine Plastikwanne überführt und 12 bis maximal 15 Minuten in Denaturierungs-Puffer, der aus 0,5M NaOH, 1,5M NaCl (beide Merck, Darmstadt, Deutschland) in DEPC-Wasser hergestellt wurde, auf einem IKA-VIBRAX VXR Rütteltisch (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) inkubiert. Dieser Puffer wurde verworfen und das Gel jetzt wieder für 12-15 Minuten auf den Rüttler in Neutralisierungs-Puffer gelegt, der 0,5M Tris-Hydrochlorid (pH 7,5) (Merck), 1,5M NaCl, 0,1M EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und DEPC-Wasser enthielt. Zuletzt wurde das Gel einige Minuten in 10xSSC (1,5M NaCl, 0,075M Na-Citrat, beide Sigma, pH 7,0) gelegt.

Währenddessen wurde eine BrightStar-Plus™ Membran (Ambion, USA) auf Gelgröße zugeschnitten und in 10xSSC äquilibriert. Anschließend wurde die Blotordnung von unten nach oben zusammengebaut: Zuerst das umgedrehte Gel auf einer Glasplatte, die mit einigen Tropfen SSC bewässert war. Darauf wurde die nasse Ambion Membran, 3 trockene Papierfilter und abschließend eine Glasplatte gelegt. Die Anordnung wurde beschwert. Zudem wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Filter befanden. Gegebenenfalls wurden diese vorsichtig ausgestrichen. Das Blotten dauerte über Nacht, wonach mit einem Bleistift sowohl die Geltaschen als auch die Membran mit Namen und GAPDH oder LL-37 markiert wurden. Die Membran wurde ungefähr eine Stunde bei 37°C getrocknet, unter UV-Licht gelegt und mit einer Energiemenge von 750kJ bestrahlt. Nach dieser Behandlung war die DNA auf der Membran kovalent gebunden („crosslinking“). Die Membran wurde in Plastikfolie eingewickelt und konnte bei RT aufbewahrt werden.

### **2.2.6 Hybridisierung**

Die Filter wurden in aufgekochter 0,1% SDS-Lösung mindestens 20-30 Minuten gelagert um gebundene Sonden zu entfernen. Sobald die Filter etwas abgekühlt waren, wurden diese in Glasbehälter gesteckt und 18ml 6X SSC, 5X Denhardt's-Lösung (bestehend aus 2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% acetyliertem BSA (alle Sigma-

Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Wasser) und 2ml 10% SDS (Endkonzentration 1% SDS) zugefügt. Mittels proteinhaltiger Denhardt's-Lösung wurde verhindert, dass die Proben später unspezifisch binden. Anschließend wurden die Tubes in einen vorgewärmten Hybridisierungssofen bei 60-65°C mindestens 4 Stunden drehend gelagert. 25-35µl einer 3-4 Minuten bei 99-100°C denaturierten und anschließend 2 Minuten noch auf Eis gekühlten radioaktiven Sonde wurden in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Tubes kamen über Nacht wieder in den Hybridisierungssofen bei 60-65°C. Nach erfolgter Hybridisierung und Entfernen der radioaktiven Lösung wurden die Filter zweimal mit einer 60°C warmen Lösung, die 2X SSC und 0,1% SDS enthielt, für jeweils annähernd 30 Minuten im rotierenden Ofen gewaschen. Die Waschlösung wurde jedes Mal verworfen und ein dritter Waschvorgang mit erwärmter 0,1% SSC im 60-65°C warmen rotierenden Ofen schloss sich an. Die Filter wurden an Luft getrocknet, in Plastikfolie eingeschweißt, mindestens 1,5 Stunden auf einen Röntgenfilm gelegt und dieser danach entwickelt.

### **2.2.7 Real-Time RT-PCR**

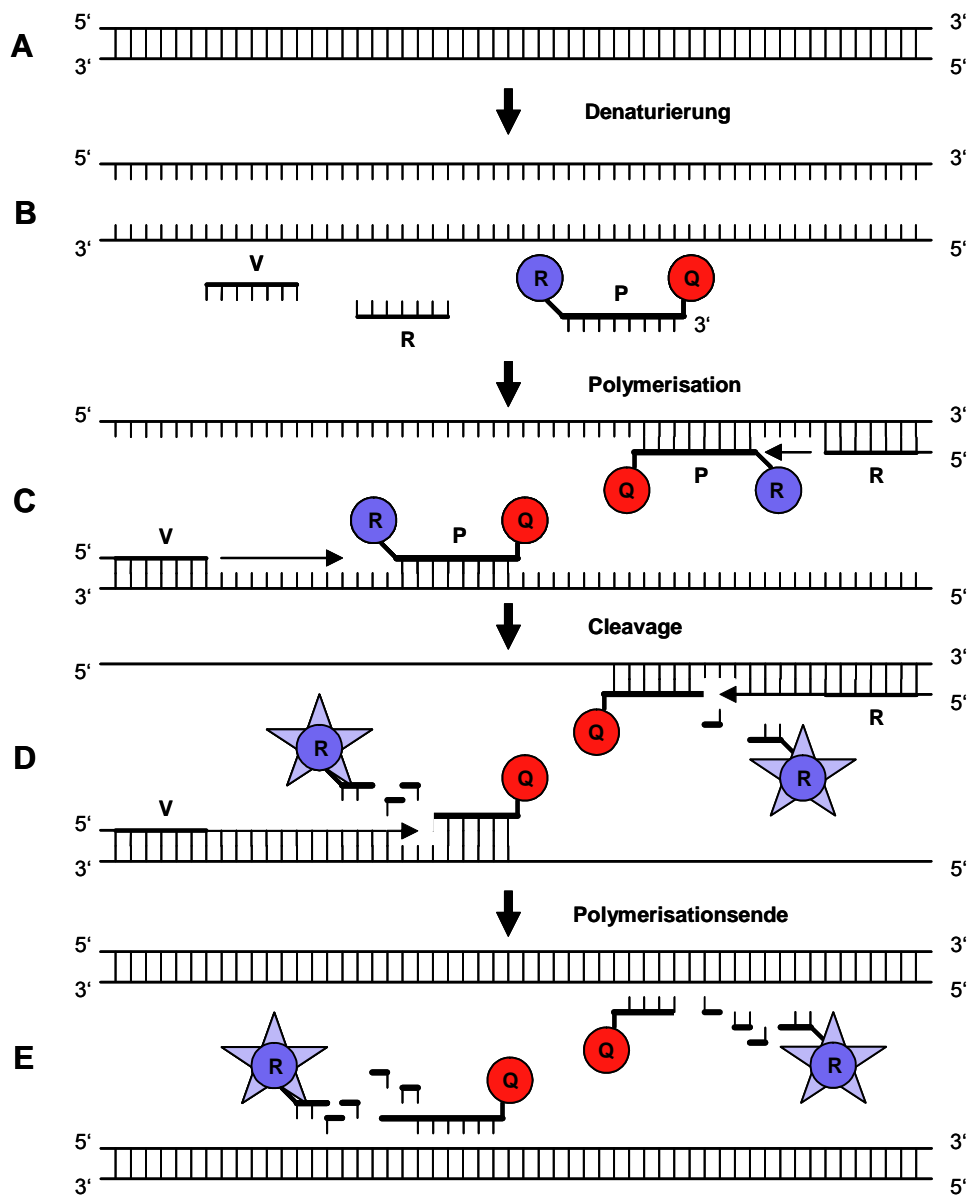
Um die Expression von LL-37 und des Housekeeping Gens G3PDH quantitativ zu bestimmen wurde ein Real-Time RT-PCR Protokoll etabliert. Dafür wurde Mastermix jeweils unterschiedlich für LL-37 und G3PDH in 15ml Falcon-Röhrchen vorbereitet. Setup für GAPDH (1X): 12,50µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 1,25µl Human GAPDH G3 [20x] (Applied Biosystems), 10,25µl RNase freies Wasser. Das GAPDH-PDAR-Housekeeping Kit amplifiziert keine GAPDH Pseudogene. Mastermix für LL-37 (1X): 12,5µl TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2,5µl Forward Primer [3µM], 2,5µl Reverse Primer [3µM], 2,5µl Probe und 4µl RNase freies Wasser. Die Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer, durch Primer Express (Applied Biosystems) konstruiert für die Quantifizierung von LL-37 mRNA, waren 5'-ACC CAG CAG GGC AAA TCT C-3', beziehungsweise 5'-GAA GGA CGG GCT GGT GAA G-3'. Die TaqMan Fluoreszenzsonde für LL-37 hatte die Sequenz 5'- TGT TAT CCT TAT CAC AAC TGA T-3' FAM-gekennzeichnet. Der Mastermix wurde für alle Proben zusammengemischt und dann davon 96µl (vorgesehen für 4 Proben) auf Eppis verteilt.

Jetzt wurde die sechsfache absteigende Verdünnungsreihe für die Standardkurve hergestellt, bei GAPDH in einem Verhältnis von 1:3 und bei LL-37 1:1. Die Standardkurve wurde mit einer bekannten Menge totaler RNA aus U937 Zellen – Monozyten – (ACC5, DSMZ Braunschweig Deutschland) erstellt. Anschließend wurde dem Mastermix, der zuvor schon auf die Eppis verteilt worden war, 4µl cDNA pro Eppendorfggefäß zugegeben, so dass 100µl Lösung in jedem Eppi waren. Eine Ausnahme davon machte die Regelung für die Proben bei jedem Mix für GAPDH. Hier wurden dem Mastermix nur 1µl cDNA und 3µl Wasser pro Eppi zugegeben. Die Endkonzentration der Proben-cDNA war demnach nur 0,25µl auf 25µl Reaktionsvolumen. Die vorbereiteten Eppis wurden kurz gevortext und eine Minute bei maximal 3000U/min zentrifugiert. Jetzt wurde die 96-Well Optical Reaction Plate mit Barcode [Code 128] (Applied Biosystems) mit jeweils 25µl nach festgelegtem Schema geladen. Alle Werte wurden in Triplikaten bestimmt, um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren. Nun wurden Optical-Caps [8 Caps/Stripe] (Applied Biosystems) aufgesetzt und festgedrückt. Kurz bevor die Platte in das PE Applied Biosystems PRISM Model 7700 Sequence Detection Instrument (ABI, Foster City, CA, USA) eingesetzt wurde, wurde sie noch maximal eine Minute bei etwa 1,5g zentrifugiert, damit die gesamte Flüssigkeit am Boden der Tubes lag. Der PCR Lauf wurde nach Eingabe der Standardwerte und der Proben gestartet. Alle Experimente wurden außerdem 3- bis 5-fach wiederholt, wobei die RNA-Extraktionen voneinander unabhängig waren. Die Ergebnisse wurden anschließend zusammengefasst und statistisch ausgewertet.

Das Protokoll für GAPDH sah 40 Zyklen (15 Sekunden bei 95°C und eine Minute bei 60°C) vor und wurde mit der Wellenlänge für VIC (530nm) gemessen. Die Amplifikation bei LL-37 umfasste 50 Zyklen (15 Sekunden bei 92°C und eine Minute bei 60°C) – FAM markiert.

Während der PCR Amplifikation spaltet die Taq-Polymerase mit Ihrer 5' nukleolytischen Aktivität die Sonde. Deren Farbstoffe, der 5' Reporterfluoreszenzfarbstoff und der 3'-Kontroll- oder Quencherfluoreszenzfarbstoff (80), fluoreszieren und die Emission kann gemessen werden (Abbildung 3).





**Abbildung 3:** Schema der Real Time RT-PCR: Während eines Zyklus **[A]** kommt es zuerst zur Denaturierung der Proben **[B]**, die zusammen mit einer fluoreszierenden Sonde (P) und den Vorwärts- (V) und Rückwärtsprimern (R) in der Lösung sind. Am 3'- beziehungsweise am 5'-Terminus der TaqMan Sonde sitzen zwei Fluoreszenzfarbstoffe, der Reporter (R, blau) und der Quencher (Q, rot). Solange beide Farbstoffe an der Sonde in räumlicher Nähe zueinander sind, ist die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes unterdrückt. Anschließend **[C]** kommt es zur Polymerisation und durch weitere Synthese des DNA-Stranges während der Amplifikation zu einer Abspaltung des Reporterfarbstoffes **[D]**. Sobald die beiden Farbstoffe voneinander getrennt sind, emittiert der Reporter sein charakteristisches Fluoreszenzspektrum. Auch der Rest der Sonde mit dem verbliebenen Quencher wird durch die Taq-Polymerase degradiert und die Komplementation des DNA-Stranges wird vollendet **[E]**. Weil das Verhältnis Strangverdopplung zur Sonde im Optimalfall eins zu eins ist, kann durch die Messung der Wellenlängen auch eine quantitative Aussage über die tatsächliche Produktmenge gemacht werden.

Die LL-37 und GAPDH Starttranskriptwerte der Standardkurven wurden beliebig festgelegt. Die LL-37 und GAPDH Werte in den unbekanntenen Proben wurden dadurch quantifiziert, dass der Schwellenwert festgelegt worden ist. Dieser diente dazu, nur die Fluoreszenzemissionen zu messen, welche diesen Wert überschritten haben. Gleichzeitig wurde der korrespondierende PCR-Zyklus auf der X-Achse abgelesen – der so genannte Ct-Wert. Der Ct-Wert korrelierte umgekehrt proportional mit dem mRNA Ausgangsniveau und so konnten unbekanntene Proben anhand der Standardkurve quantifiziert werden. Daraufhin wurde der Quotient aus LL-37/GAPDH Transkripten gebildet. Um Expressionsunterschiede zu verdeutlichen, wurden die LL-37 Expressionslevel in der Mediumkontrolle bei LL-37 exprimierenden Zellen (HT-29, Geki-2 Zellen) auf eins gesetzt. Die relative LL-37 Expression wurde errechnet indem die LL-37 Expression in behandelten Zellen in Beziehung zum Expressionsniveau in Kontrollzellen gesetzt wurde. Die Zelllinien SW620 und SW480 exprimierten sowohl unbehandelt als auch mit der Mediumkontrolle behandelt kein LL-37. Um in diesen Zellen in Abhängigkeit verschiedener Faktoren die LL-37 Expression zu quantifizieren, wurde die LL-37 Expression nach 24-stündiger Behandlung mit 2mM Butyrat als eins definiert und alle anderen Expressionslevel von LL-37 dazu als relative Induktion angegeben.

## **2.2.8 Western Blot**

### **2.2.8.1 Proteinaufbereitung für den immunologischen Nachweis von LL-37 in einem Western-Blot**

Nach Behandlung der oben beschriebenen Zelllinien wurde das Zellkulturmedium in Falcon-Röhrchen gesammelt und bei  $-70^{\circ}$  eingefroren. Die Inkubation erfolgte ohne FBS und eventuell sogar ohne Antibiotika. Es wurden sowohl der Zellkulturüberstand als auch die Zellpellets im Western Blot untersucht, um das antimikrobielle Peptid LL-37 nachzuweisen. Dazu wurde ein Proteinaufreinigungsprotokoll mittels OASIS C18 Filtern (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) etabliert. Um diese Peptide im Überstand zu finden, wurden vorher beschriftete OASIS-Filter (C18) (Waters) aktiviert. Das geschah mit 5ml 100% Acetonitril (AcN) (Merck Sharp & Dohme GmbH, Haar,

Deutschland) und 15ml 0,1% TFA. Um eine Konzentration von 0,1% zu erreichen wurde dem Zellkulturmedium Trifluor-Essigsäure (TFA) (Merck) zugesetzt. Das Zellkulturmedium wurde über die OASIS-Filter filtriert und das Eluat verworfen. Hiernach wurden die Filter mit 5ml 0,1% TFA (Merck) gespült. Ein zweiter Spülschritt mit 5ml 10% AcN in 0,1% TFA (beide Merck) schloss sich an. Anschließend wurden die Peptide aus den OASIS-Filtern eluiert. Dazu wurde der Filter einmal mit 1ml 80% AcN in 0,1% TFA und dann einmal mit 1ml 100% AcN in 0,1% TFA in je ein RIA Röhrchen ausgewaschen. Die RIA Röhrchen wurden mit durchlöcherter Folie zugeklebt und alle Proben bei  $-70^{\circ}$  mindestens 12 Stunden eingefroren. Die Gefriertrocknung/Lyophilisation mit der Gefriertrocknungsmaschine Alpha 2-4 (Christ, Deutschland) führte zu einem Wasserentzug aus dem gefrorenen Material. Das Trocknen erfolgte dabei unter Umgehen des flüssigen Aggregatzustandes durch Sublimation, d.h. direkte Überführung von Eis in Dampf. All dies geschah unter Vakuum, wobei in den eingebrachten Proben Temperaturen zwischen  $-10^{\circ}\text{C}$  bis  $-70^{\circ}\text{C}$  herrschten. Die Gefriertrocknung ist ein sehr schonendes Verfahren zur Konservierung empfindlicher Gewebe und Gewebebestandteile mit dem Ziel, ein leicht wasserlösliches Produkt zu erhalten, das nach Hinzufügen von Wasser die Eigenschaften des Ausgangsproduktes unverändert aufweist. Alle Proben wurden in flüssigem  $\text{N}_2$  transportiert und schnellstmöglich in den Gefriertrockner gestellt, um ein Antauen der Proben zu verhindern. Das Vakuum wurde angelegt und mindestens über Nacht lyophilisiert. Das erhaltene Peptidpulver wurde in  $100\mu\text{l}$  0,1% TFA (Merck) resuspendiert und gevortext. Die Lösung wurde jeweils in ein 1,5ml Eppi überführt, kurz bei 7500 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi überführt.

Um in den Zellpellets das antimikrobielle Peptid LL-37 nachzuweisen, wurden diese in  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem Lysis Buffer (20mM Tris-HCl, 1mM EGTA,  $50\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 50mM NaF, 0,01U/ml Aprotinin,  $1\mu\text{g/ml}$  Leupeptin,  $1\mu\text{M}$  Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1mM Elastinal und  $10\mu\text{g/ml}$  Pepstatin (pH 7,4; alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, außer Tris-HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und danach für 10 Sekunden ultraschallbehandelt (Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin, Deutschland). Die Lysate wurden dann bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten bei 7500U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

### **2.2.8.2 Proteinkonzentrationsmessung**

Die Proteinkonzentrationen der Lysate und Überstände wurden photometrisch bei 750nm durch das Tecan-Spectra-Spektroskop (Tecan, Crailsheim, Deutschland) ermittelt. Dazu wurde 230µl 0,1%TFA (Merck Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland) als Leerwert pipettiert, dessen Wert bei den anderen unbekanntem Werten anschließend subtrahiert wurde. Eine Standardkurve mit Rinderalbumin (BSA Fraction V, Boehringer, Mannheim) wurde angesetzt. Die erste Lösung der absteigenden Verdünnungsreihe enthielt 5mg/ml Albumin; dann wurde immer 1:1 mit 0,1% TFA (Merck) verdünnt. Pro Verdünnung wurden jeweils 5µl für die Messung entnommen, dagegen wurde nur 1µl pro Probe in jedes well geladen; jeder Wert wurde doppelt bestimmt. Dann wurden zu jedem well 25µl Protein-Assay Reagent A (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegeben und schließlich auch noch in jedes well 200µl Reagent B (Bio-Rad). Die Platte wurde 15 Minuten stehen gelassen und dann die Messung gestartet. Die Proteinmengen wurden mit WinFitting berechnet.

### **2.2.8.3 Western-Protokoll LL-37**

Für die Western-Blot-Probenvorbereitung wurde SDS Sample Buffer benötigt (2ml 1M Tris-Hydrochlorid mit pH 6,8 (Merck, Darmstadt, Deutschland); 4ml 100% Glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 2ml 10% SDS; 0,8ml 0.5% Coomassie Blue G (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und 1ml doppelt destilliertes Wasser). Der Puffer wurde durch einen 0,2µm Filter (Falcon, Heidelberg, Deutschland) gefiltert und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dieser Sample Buffer (SB) wurde weiterverarbeitet und mit Mercaptoethanol (Sigma) vermischt (2µl pro 100µl SB). Es wurde pro Spur die Proteinmenge für den späteren Western-Blot berechnet. Jede Geltasche wurde mit gleichen Proteinmengen beladen. Unter Umständen wurde deswegen eine Verdünnung mit 0,1% TFA (Merck) notwendig. Die Proben wurden jetzt in einem 1,5ml Eppendorf Röhrchen mit SB vermischt. Das Verhältnis zwischen Probe und SB war 1:2. Dann wurden die Proben 1 Minute bei 5000U/min zentrifugiert und 1 Stunde bei 56°C im vorgewärmten Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden sie im Wärmeblock 5 Minuten auf 95°C erhitzt und noch einmal 1 Minute bei 5000U/min

zentrifugiert.

#### **2.2.8.4 Elektrophorese**

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

#### **2.2.8.5 Blotting**

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch auf eine auf Filtergröße zurechtgeschnittene, mit 100% Methanol kurz aktivierte PVDF Membran (Immobilion-membrane, Millipore, Bedford, MA, USA) mittels Elektroblothing bei konstanter Stromstärke von 150mA überführt (Trans Blot System, Bio-Rad; EC-Apparatus EC140, EC-Apparatus Co., Holbrook, NY, USA). Dazu wurden die aktivierte PVDF Membran, Schwämme und Whatman-Filterpapier in 200ml Methanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 100ml Transfer Buffer (30,3gr Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland), 144gr Glycin (Sigma), ad 1000ml DEPC-Wasser) und 700ml doppelt destilliertes Wasser eingelegt. Ebenso wurde das Gel kurz in Transfer Buffer gelagert. In der Blottanordnung wurden die Membran und das Gel direkt aufeinander gelegt und von beiden Seiten mit zurechtgeschnittenem Filterpapier und Schwämmen belegt.

### **2.2.8.6 Färbung**

Nach dem Blotten wurde die Membran aus der Blottanordnung gelöst und 5 Minuten in PBS (Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Darauf folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen in 15ml 5% Milch in PBS 0,25% Tween für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran 5 Minuten in PBS gewaschen. Worauf die Inkubation mit 10ml des 1:1000 verdünnten Primärantikörpers (Karolinska Institutet, Stockholm Schweden) in 5% Milch in PBS bei 4°C über Nacht folgte. Die ungebundenen Reste des Primärantikörpers wurden durch 5-minütiges Waschen mit PBS und 0,25% Tween und zweimaligem 10-minütigen Waschvorgang mit reinem PBS abgespült. Anschließend folgte die Inkubation mit 10ml eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers (Anti-Rabbit 1:1000, Karolinska Institutet, Stockholm Schweden) in 5% Milch in PBS für eine Stunde bei RT. Es schlossen sich vier weitere Waschvorgänge an: Einmal 5 Minuten mit PBS und 0,25% Tween; zweimal je 10 Minuten mit PBS und abschließend 5 Minuten mit doppelt destilliertem Wasser. Der Sekundärantikörper wurde mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mit Filterpapier getrocknet und dann 5 Minuten lang mit je 1ml beider Reagenzien des Super-Signal® West Pico Trial Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) entwickelt. Bei dieser Nachweismethode kommt es zu einer HRP-katalysierten Oxidation von Diazylhydrazid und nachfolgender Lichtemission, welche durch Belichtung von lichtsensitiven Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham; USA) detektiert wird. Die Belichtungszeiten lagen hierbei zwischen wenigen Sekunden und mehreren Minuten.

### **2.2.9 Immunhistochemie**

Gesunde kolorektale Mucosa und Biopsiematerial aus dem distalen Ileum von Patienten aus anderen Studien (81) und von Patienten, die sich einer Routinekoloskopie unterzogen hatten, wurden analysiert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg gebilligt. Die Biopsien wurden mit einer Standardbiopsiezange entnommen und unverzüglich in 0,1% Formalin (Merck,

Darmstadt, Deutschland) gelagert. Anschließend wurden die Biopsien in einen Paraffinblock gebettet und konnte mit dem Jung SM 2000R Mikrotom (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) in ungefähr 3-4µm dicke Schichten geschnitten werden. Die abgehobelten Schnitte wurden mit Streckwasser auf einer 30°C Wärmeplatte vorbehandelt und dadurch in die Länge gezogen. Das Streckwasser wurde immer frisch aus 40ml doppelt destilliertem Wasser, 10ml Aceton (J.T.Baker, Deventer, Holland) und 0,5ml Eiweiß-Glycerin (Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH+Co, Köngen/N., Deutschland) angesetzt und filtriert. Laut Färbeprotokoll wurden alle Schnitte zuerst dreimal jeweils für 10 Minuten mit Xylol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) entparaffiniert, darauf folgten gestaffelte Waschvorgänge zweimal 5 Minuten mit 100% Ethanol (J.T.Baker), zweimal mit 90% Ethanol für 5 Minuten und zweimal jeweils 5 Minuten mit 70% Ethanol. Die Biopsien wurden nach der Ethanollagerung 30 Minuten bei RT mit 200ml 100% Methanol (J.T.Baker) weiterbehandelt, der mit 5ml konzentriertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) versetzt war. Nun wurden die Biopsien zweimal 5 Minuten mit PBS/BSA (36gr NaCl, 7,4gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, doppelt destilliertes Wasser, pH 7,4) auf dem IKA-Vibramax-VXR (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gespült. Immer erst am Färbetag wurde pro Liter PBS 0,5gr BSA zugegeben. Pro Schnitt wurden 100µl des 1:10 verdünnten Proteinblockreagens (Power Block<sup>TM</sup> Universal Blocking Reagent, Biogenex, San Ramon, CA, USA) aufgetragen und 7 Minuten bei RT in der feuchten Kammer gelagert. Es wurde zweimalig 1 Minute lang mit PBS/BSA auf dem Vibramax gespült. Die Serienschnitte wurden dann mit einer 1/1000 Verdünnung eines spezifischen polyklonalen LL-37 Kaninchenantisera (2,5 µg/µl) über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Für Negativkontrollen wurden Biopsien ohne den ersten Antikörper gefärbt; beziehungsweise wurde der erste Antikörper zuvor schon von einer Überschussmenge an synthetisch hergestellten LL-37 Peptid absorbiert und somit geblockt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder auf dem Vibramax zweimal für 1 Minute in PBS/BSA gewaschen. Aus dem Biotin-Streptavidin Detektionssystem (Multilink®, BioGenex) benutzten wir 1-3 Tropfen Multilink und 1-3 Tropfen Label. Dazwischen und danach wurden die Proben 30 Minuten bei RT in der feuchten Kammer gelagert und wieder zweimal je 1 Minute mit PBS/ BSA auf dem Vibramax gespült. Entwickelt wurden die Schnitte in 200µl einer Lösung bestehend aus 7,88gr Tris-

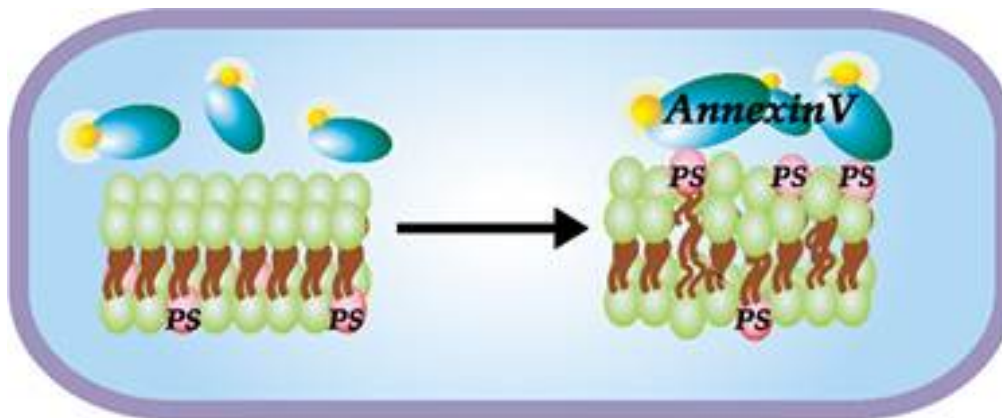
Hydrochlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland), die bei pH 7,6 in 1l destilliertem Wasser gelöst worden waren, dem 40mg DAB (Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 35µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) zugesetzt waren. Die Entwicklung wurde beim zweiten Antikörper je nach gewünschtem Ergebnis nach 1-2 Minuten mit PBS/BSA gestoppt und das Präparat zusätzlich 1-2 Minuten unter destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Präparate für maximal 3 Sekunden in Mayer's Hämalaun (Merck) gelagert, danach folgte das Bläuen (10-minütiges Waschen mit fließendem lauwarmem Wasser). Die Proben wurden schlussendlich in eine aufsteigende Alkoholreihe gelegt und dann mit Entellan (Merck) eingedeckt.

### **2.2.10 Theoretischer Hintergrund der Apoptosebestimmung durch eine Annexin V– Propidiumjodid– Doppelfärbung**

Ein am Anfang der Apoptose stehendes Ereignis in den Zellen ist die Externalisation von Phosphatidylserin. Phosphatidylserin ist ein Bestandteil der zellulären Membran, der in der lebenden Zelle nur an der Innenseite der Zellmembran zu finden ist. Tritt die Zelle in den Apoptoseprozess ein, ist eine der ersten Reaktionen diese Externalisation von Phosphatidylserin. Diese Reaktion liegt zeitlich deutlich vor anderen Ereignissen wie DNA-Strangbruch oder morphologisch erkennbaren Veränderungen. Annexin V geht eine spezifische Bindung mit dem an die Zelloberfläche gelangten Phosphatidylserin ein. Zellen, deren Tod durch Nekrose eintritt, zeigen keine Externalisation von Phosphatidylserin.

Ein anderes Ereignis im Ablauf des programmierten Zelltodes ist der Verlust der Membranintegrität. Während dieses Ereignis in der Nekrose sehr plötzlich auftritt, also eine Art on-off-Reaktion vorliegt, zeichnen sich Zellen in der Apoptose durch einen allmählichen Verlust der Membranintegrität aus. Diesen Effekt macht man sich zunutze, um Annexin V-negative und -positive Zellen nochmals zu differenzieren. Werden nicht vorpermeabilisierte Zellen mit Propidiumjodid, einem DNA-Interkalator ohne Bevorzugung spezifischer Basen, inkubiert, nehmen es diese gemäß der Durchlässigkeit ihrer Membran auf.

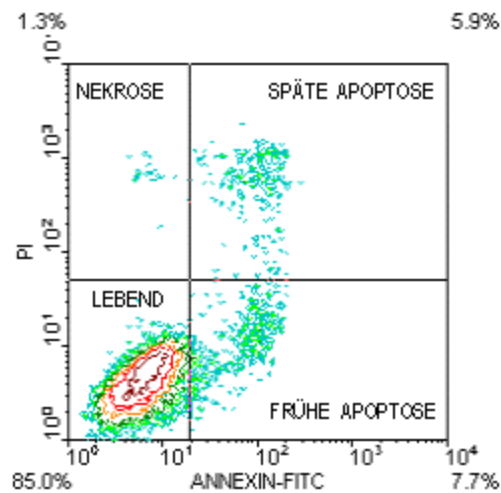




**Abbildung 4:** In der Apoptose wechselt Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite und ermöglicht so die Bindung von Annexin V. Entnommen aus B-bridge International.

Es ergeben sich also vier Populationen mit unterschiedlichen Färbereigenschaften: Lebende Zellen sind sowohl für Annexin V als auch für Propidiumjodid negativ. Die Zellen in der frühen Apoptose binden zwar bereits Annexin V, lassen aber noch kein Propidiumjodid durch ihre Membran. Mit Verlust der Membranintegrität beginnen die Zellen nun Propidiumjodid aufzunehmen, es ergibt sich eine Subpopulation spätapoptotischer Zellen bzw. von Zellen, die die Apoptose bis hin zum endgültigen Zelltod durchlaufen haben. Diese Zellen binden nun sowohl Annexin V als auch Propidiumjodid. In dieser Phase sind die Zellen dann auch bereits durch andere Vorgänge der Apoptose wie DNA-Strangbruch gekennzeichnet (82).

Ist der auf die Zellen einwirkende Stress nun so groß, dass sie nicht in der Lage sind, den Weg der Apoptose zu beschreiten, werden sie nekrotisch. Das heißt, es kommt nicht mehr zur Externalisierung von Phosphatidylserin, jedoch zu einem sehr schnellen Aufbruch der Zellmembran. Zellen in der Nekrose binden also nur noch Propidiumjodid und kein Annexin V (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Lebende Zellen sind negativ für Annexin V und Propidiumjodid, in der frühen Apoptose färben sie positiv für Annexin V. Mit zunehmender Membranpermeabilität nehmen sie Propidiumjodid auf, gehen also in die Spätphase der Apoptose über. Direkt geschädigte, nicht-apoptotische und nekrotische Zellen werden lediglich für Propidiumjodid positiv.

Nicht bei allen Autoren wird immer zwischen spätapoptotischen und direkt nekrotischen Zellen differenziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die hier als frühapoptotisch bezeichnete Zellen einen weiteren Schritt der Apoptose, den durch die TUNEL-Reaktion (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) nachweisbaren Strangbruch der DNA, noch gar nicht zeigen (82). In den hier als spätapoptotisch bezeichneten Zellen lässt sich der Strangbruch jedoch mittels TUNEL-Reaktion nachweisen (82).

Außerdem ist die Apoptose adhärenter Epithelzellen teilweise nur durch Annexin V nachweisbar, da die Zellen vom Boden der Kulturgefäße abskilfern, bevor mit TUNEL-Reaktionen Strangbrüche nachweisbar werden (83). Um im folgenden also die Apoptose der gesamten Population zu betrachten, soll aus den genannten Gründen als Rate apoptotischer Zellen die Summe frühapoptotischer, also TUNEL negativer, und spätapoptotischer, TUNEL positiver, Zellen betrachtet werden.

Der Nachweis mittels Annexin V-Propidiumjodid-Doppelfärbung erlaubt demnach eine schnelle und methodisch einfache Bestimmung der Apoptose.

### 2.2.11 FACS-Analyse

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

Pro Probe wurden nun je 5µl Annexin V-FITC (Sigma, 10µg/ml in CBB) in ein 12 Millimeter x 75 Millimeter messendes Reaktionsgefäß vorgelegt, in dieses wurden nun 495µl der Zellsuspension überführt und sachte gevortext. Die Proben wurden nun für 13 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert und im Anschluss 5 Minuten lang bei 1000U/min und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Nun wurden 5µl einer Propidiumjodidlösung (Sigma, 50µg/ml in PBS) vorgelegt, das Pellet mit 500µl CBB gelöst und danach für 15 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen nochmals für 5 Minuten bei 1000U/min und 4°C abzentrifugiert und erneut in 500µl CBB gelöst.

Nach der Färbung wurden die Proben bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Sämtliche Schritte wurden auch jeweils mit einem Aliquot jedes Versuchsansatzes durchgeführt, ohne dass eine Färbung mit Annexin V oder Propidiumjodid vorgenommen wurde. Diese Proben werden im weiteren Text als Leerwerte bezeichnet. Zur Kompensation wurde pro Versuchsansatz ein Aliquot nur mit Annexin und eines nur mit Propidiumjodid gefärbt.

Die Proben wurden auf einem FACScan (Beckton Dickinson, Mannheim, Deutschland) nach Anregung durch einen 488nm-Laser unter Verwendung von Lysis II Software (Beckton, Dickinson, USA) gemessen, die Messung erfolgte binnen zwei Stunden nach Abschluss der Färbung. Die Zellpopulation wurde in einem Forward Scatter (FSC) – Sideward Scatter (SSC) - Dot Plot dargestellt, FSC und SSC wurden linear definiert. Die Annexin V-Bindung wurde über die Intensität des gekoppelten FITC auf FL-1

gemessen, die Menge des gebundenen Propidiumiodids in FL-3 um eine Überstrahlung durch FITC zu vermeiden. Um eine Einstrahlen von Propidiumjodid in FL-1 zu vermeiden, wurde folgende Kompensationseinstellung durch die nur einfach gefärbten Proben ermittelt: FL-1 – FL-2: 0,2%, FL-2 – FL-1: 38,9%, FL-2 – FL-3: 42,8% und FL-3 – FL-2: 8,3%. Die Darstellung der Kanäle FL-1 und FL-3 erfolgte logarithmisch. Die Grundeinstellung zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz, ohne die eine Beurteilung der Zunahme der Fluoreszenz durch Annexin V- oder Propidiumjodid-Bindung nicht möglich wäre, wurde für jede Probe mit dem zugehörigen Leerwert vorgenommen. Es wurden bei schneller Zählrate 30000 Zellen pro Probe gemessen.

Die Daten wurden aus dem HP-Format von Lysis II mittels LIFUTIL (Hewlett-Packard LIF Utilities for the PC, © HP 1990-92) in eine MS-DOS-Datei umgewandelt. Die Auswertung erfolgte dann mit WIN.MDI 2.8 (Joseph Trotter, © 1993-98) auf einem Windows NT-Rechner. Beide Programme sind auf der TSRI Cytometry Software Page als Download zu finden.

In der Auswertung wurden die Zellpopulationen wieder im FSC-SSC-Dot Plot dargestellt. Zellfragmente, die sich durch extrem niedrige Werte auszeichnen, wurden ebenso durch Setzen von Regionen ausgeklammert wie Dimere mit deutlich überhöhten Werten. Die Grenzen für eine spezifische Anfärbung mit Annexin V bzw. Propidiumjodid wurden über eine deutliche Zunahme gegenüber der unspezifischen Fluoreszenz der Leerwerte bestimmt.

### **2.2.12 Differenzierungsuntersuchung**

Die Aktivität der Alkalische Phosphatase (AP) wurde benutzt um die Differenzierung in den untersuchten Zelllinien zu messen. Die AP Aktivität ist ein anerkannter Surrogatmarker für die Kolonzellendifferenzierung (63, 84-87). Für diese Untersuchung wurden die adhärent wachsenden Zellen mit kaltem PBS gewaschen, abgelöst, mit Ultraschall behandelt (zweimal für 20 Sekunden) und bei einer Temperatur von 4°C und 5000U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde die AP Aktivität im Überstand nach Hydrolyse bei pH9,8 und 25°C gemessen (Modular, Roche Diagnostics, USA). Zellproteinkonzentrationen wurden durch eine modifizierte Lowry Untersuchung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Bio-Rad Laboratories GmbH, München,

Deutschland) bestimmt. Die Enzymaktivität wurde in milli-Units (mU) pro mg Protein ausgedrückt; eine Einheit entsprach der Menge an Enzymaktivität, die dafür nötig war, ein  $\mu\text{mol}$  Substrat in der Minute zu hydrolysieren.

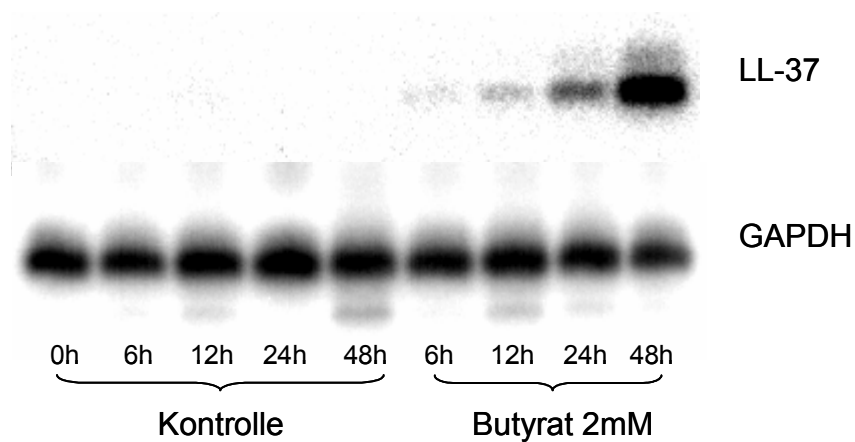
### **2.3 Statistische Analysen**

Alle statistische Analysen wurden mit SigmaStat Version 2,03 (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde angewandt, um die Daten auf Normalverteilung zu setzen. Der Student's t-Test wurde darauf für die Berechnung statistischer Unterschiede zwischen den Versuchen und der Kontrolle eingesetzt. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0.05$  angenommen. Die dargestellten Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei verschiedenen voneinander unabhängigen Experimenten.

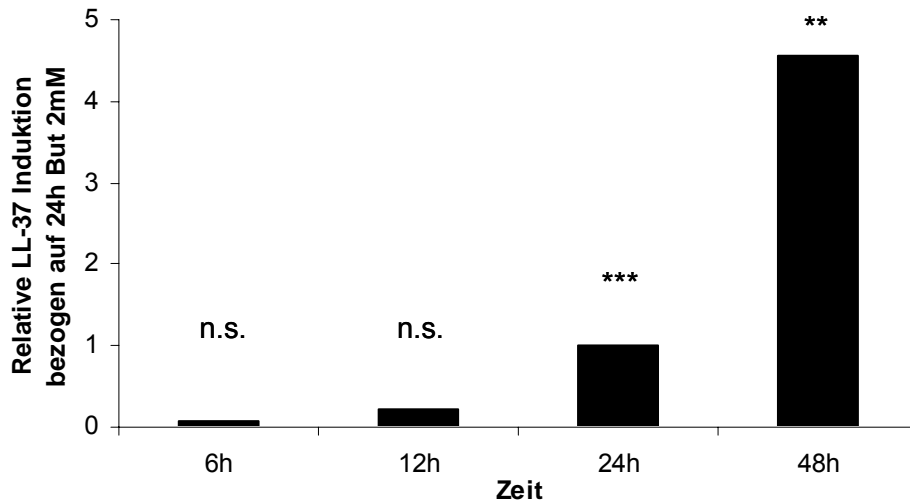
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Butyrat induziert sowohl die LL-37 Expression in Kolonepithelzellen als auch die AP Aktivität, als Marker für Kolonzelldifferenzierung

Sowohl in semiquantitativen, wie auch in quantitativen Real-Time RT-PCR Analysen von SW620 und SW480 Kolonzellen konnte basal kein LL-37 mRNA Transkript nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit Butyrat (2mM) wurde eine Induktion der LL-37 Transkription nach 6 Stunden in SW620 und SW480 Zellen festgestellt (Abbildung 6 und 7).

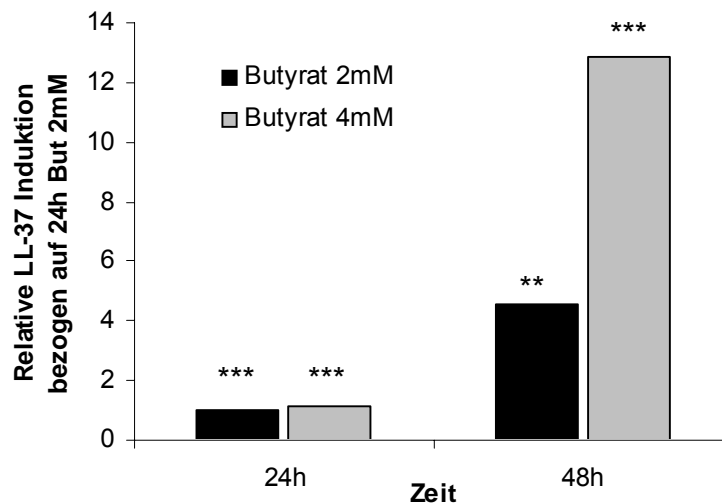


**Abbildung 6:** Zeitabhängige LL-37/CAMP Induktion durch Butyrat in SW620 Kolonepithelzellen. Die Expression von LL-37 nach Inkubation mit Butyrat 2mM wurde durch Southern Hybridisierung einer RT-PCR dargestellt. Die Angleichung der cDNA-Templates erfolgte durch eine semiquantitative PCR auf das Housekeeping Gen GAPDH (unten). Die gleiche Menge cDNA wurde auch bei dem Zielgen LL-37 eingesetzt (oben).



**Abbildung 7:** Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der LL-37/CAMP Expression in SW620 Kolonzellen. Die Zellen wurden mit Butyrat (2mM) inkubiert und anschließend mit der Real-Time RT-PCR analysiert. LL-37 Transkripte konnten zu keinem Zeitpunkt der Versuche in den mit Medium behandelten Kontrollen bei SW620 Zellen entdeckt werden. Um eine selektive Darstellung der Expression von LL-37 zu erhalten, wurden die LL-37 Transkripte deshalb relativ zu der Induktion nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat 2mM dargestellt (n.s.: nicht signifikant; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Wurden die Inkubationsperioden verlängert, so resultierte daraus eine zeit- und dosisabhängige Induktion der LL-37 Transkription mit einem Maximum nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat 4mM (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der LL-37/CRAMP Expression in SW620 Kolonzellen. Die Zellen wurden mit Butyrat 2mM und 4mM inkubiert und anschließend mit der Real-Time RT-PCR analysiert. LL-37 Transkripte konnten zu keinem Zeitpunkt der Versuche in den mit Medium behandelten Kontrollen bei SW620 Zellen detektiert werden. Die Ergebnisse der Expression von LL-37 sind in Relation zu der Induktion nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat 2mM dargestellt und gemittelt (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Die dargestellten Ergebnisse in SW620 Kolonepithelzellen konnten mittels Analysen an SW480 Zellen, einer verwandten Kolonzelllinie, bestätigt werden.

Ähnliche Ergebnisse wie bei SW620 Kolonkarzinomzellen konnten bei HT-29 Zellen erhalten werden. Bei HT-29 Kolonepithelzellen konnten ohne Stimulation jedoch schon geringe LL-37 Expressionslevel beobachtet werden. In dieser Zelllinie kam es ebenfalls zu der schon weiter oben beschriebenen zeitabhängigen Induktion durch Butyrat. Die mit 2mM Butyrat behandelten HT-29 Zellen zeigten eine um im Mittel 4,5-fach erhöhte LL-37 Expression nach 6 und 12 Stunden, 16,5-fach nach 24 Stunden und 68-fach nach 48 Stunden (Abbildung 9).

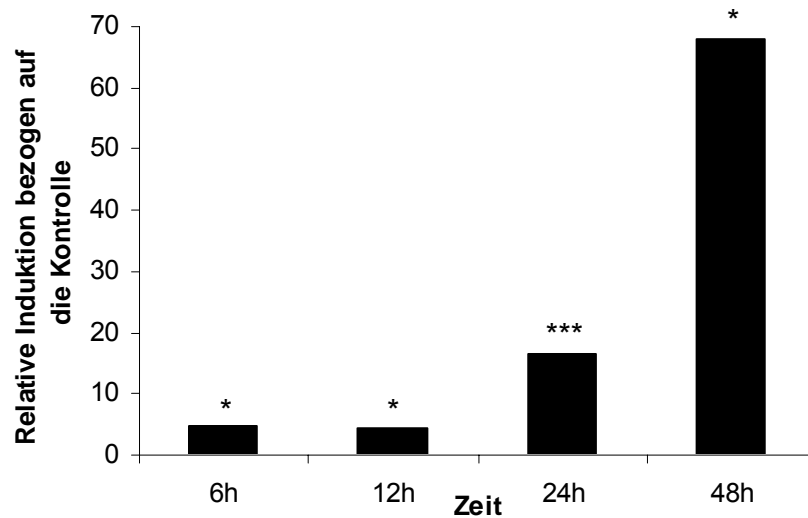
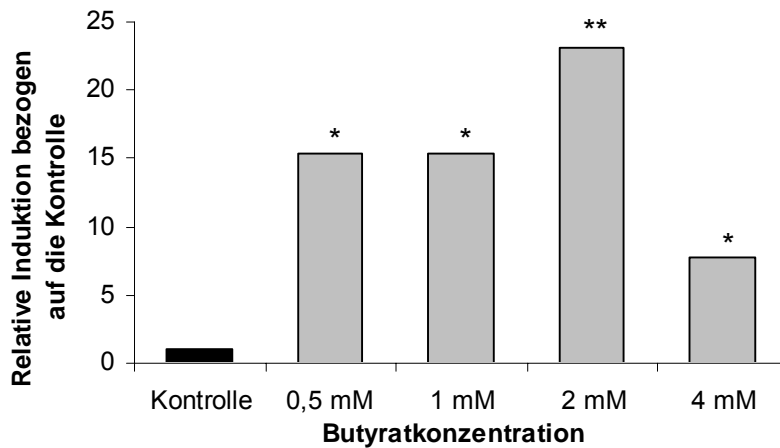


Abbildung 9: Induktion der LL-37 Transkription in HT-29 Kolonzellen, die mit 2mM Butyrat inkubiert wurden. Die Ergebnisse von LL-37 sind in Relation zur Induktion der entsprechenden mit Medium behandelten Kontrolle bei HT-29 Zellen dargestellt. Werte entstammen aus Real-Time RT-PCR-Analysen und wurden gemittelt (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

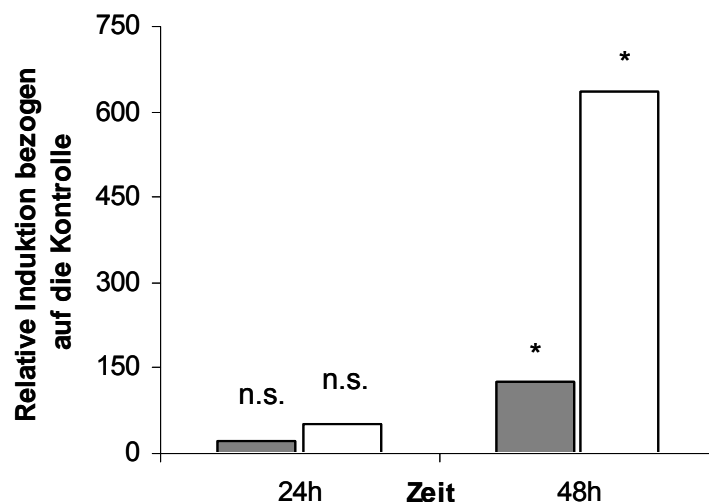
Die Inkubation mit unterschiedlichen Butyratkonzentrationen zeigte auch eine dosisabhängige LL-37 Induktion nach 24 Stunden. Jeweils verglichen mit der unbehandelten Kontrolle kam es zu einem 15-fachen Anstieg bei 0,5mM und 1mM Butyrat. Noch deutlicher war die Induktion bei einer Butyratkonzentration von 2mM (23-fach), wohingegen dieser Effekt bei 4mM Butyrat (8-fach) nicht ganz so ausgeprägt war (Abbildung 10).





**Abbildung 10:** Real-Time PCR Daten der durch unterschiedliche Butyratkonzentrationen von 0,5mM bis 4mM induzierten LL-37 Transkription in HT-29 Kolonzellen nach 24 Stunden. Die Ergebnisse von LL-37 sind in Relation zur Induktion der entsprechenden mit Medium behandelten Kontrolle bei HT-29 Zellen dargestellt. Werte sind gemittelt und stammen aus Real-Time RT-PCR-Analysen (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

Wie auch in HT-29 Kolonepithelzellen zeigten unbehandelte Geki Zellen schon geringe LL-37 Expressionslevel; durch Butyratstimulation ergab sich ebenso eine gesteigerte Induktion der LL-37 mRNA Transkription. Geki2 Kolonzellen, die mit Butyrat (2mM) inkubiert wurden, zeigten jeweils im Mittel einen 26-fachen Anstieg der LL-37 Transkriptzahlen nach 24-stündiger Inkubation und eine 126-fache Induktion nach 48 Stunden verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 11). Nach 24 Stunden mit einer 4mM Butyratlösung stieg das LL-37 Transkript um das 52-fache (gemittelt), beziehungsweise um das 693-fache nach 48 Stunden jeweils im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Induktion der LL-37 Transkription in Geki2 Kolonzellen, die mit 2mM (grauer Balken) und 4mM (weißer Balken) Butyrat inkubiert wurden. Die Ergebnisse von LL-37 bei Geki2 Zellen sind als relative Induktion zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. (n.s.: nicht signifikant; \*:  $p < 0,05$ ).

Gleichzeitig induzierte Butyrat die Zelldifferenzierung in allen untersuchten Zelllinien, was über die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität im Zellhomogenisat gemessen wurde. Nach 24-stündiger Inkubation war die AP Aktivität in SW 620 Zellen im Vergleich zur Kontrolle im Mittel um das 19-fache gestiegen. Nach 48 Stunden Inkubation konnte ein Anstieg der AP Aktivität um den Faktor 28 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 12).

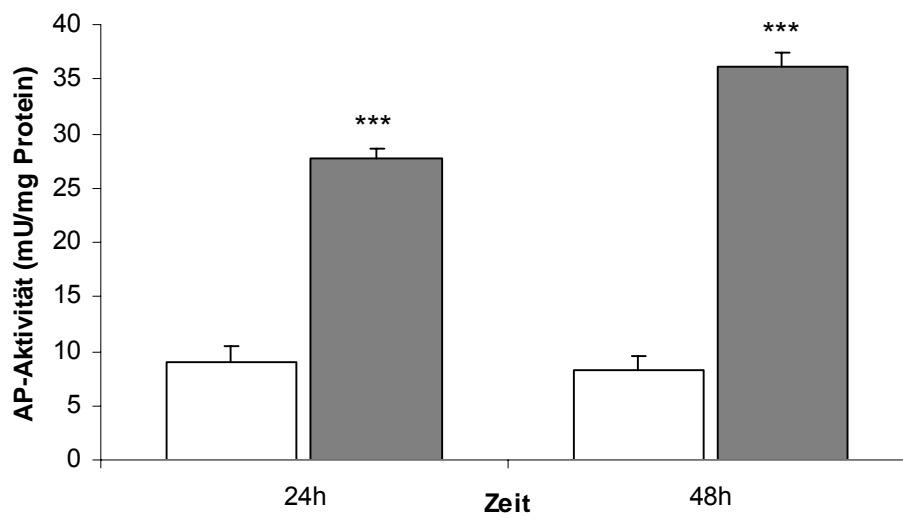
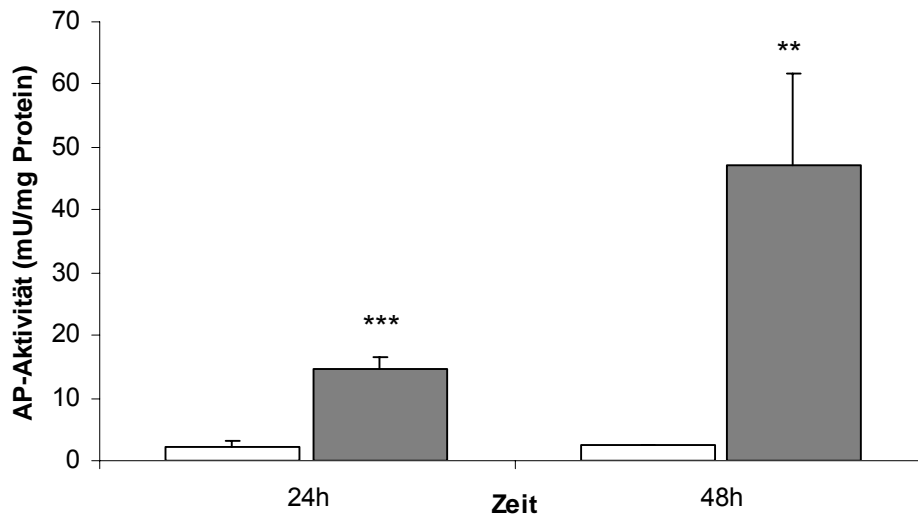


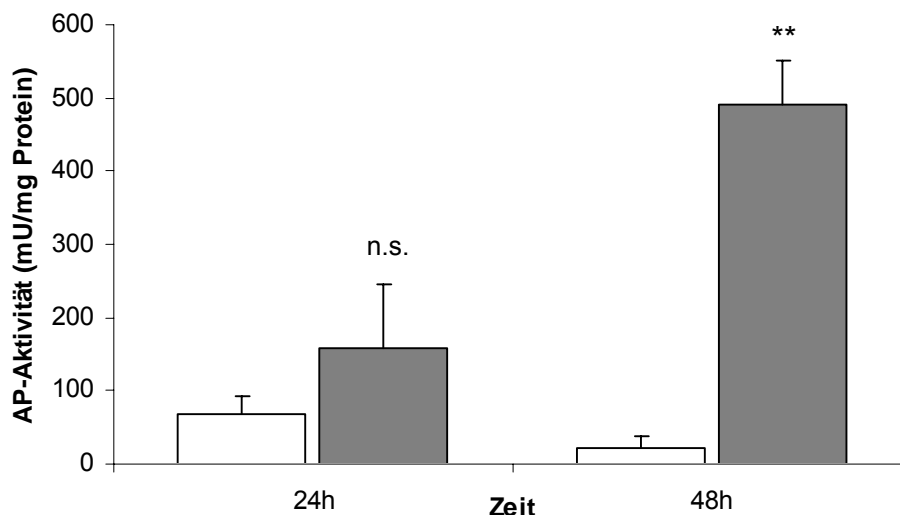
Abbildung 12: Der Effekt von Butyrat auf die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität in SW620 Kolonepithelzellen. Die Zellen wurden mit Medium (weißer Balken) oder Butyrat (2mM) (grauer Balken) inkubiert. Die Werte sind in mU der AP-Aktivität pro mg zellulärem Protein und als Mittelwerte + SD dargestellt (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der HT-29 Kolonzelllinie erhalten werden. Dort induzierte eine Behandlung mit 2mM Butyrat die AP Aktivität um den Faktor 14 nach 24 Stunden und um den Faktor 47 nach 48 Stunden (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Der Effekt von Butyrat auf die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität in HT-29 Kolonepithelzellen. Die Zellen wurden mit Medium (weißer Balken) als Kontrolle oder mit Butyrat (2mM) (grauer Balken) für bis zu 48 Stunden inkubiert. Die Werte sind in mU der AP-Aktivität pro mg zellulärem Protein und als Mittelwerte + SD dargestellt (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

In Geki2 Kolonzellen induzierte die Butyratbehandlung die AP Aktivität ebenfalls signifikant. Unbehandelte Geki2 Zellen zeigten schon eine deutlich erhöhte AP Aktivität im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien (nach 24 Stunden bei 69mU/mg Protein, nach 48 Stunden bei 21mU/mg Protein) und stieg erst bei längerer Butyratinkubation von 48 Stunden (nach 24 Stunden bei 157mU/mg Protein, nach 48 Stunden bei 490mU/mg Protein) über das Signifikanzniveau (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität unter Butyratinkubation in Geki2 Kolonepithelzellen. Die Zellen wurden mit Butyrat (2mM) (grauer Balken) oder mit Medium alleine (weißer Balken) für bis zu 48 Stunden inkubiert. Die Werte sind in mU der AP-Aktivität pro mg zellulärem Protein angegeben und stellen Mittelwerte + SD dar (n.s.: nicht signifikant; \*\*:  $p < 0,01$ ).

### **3.2 Die Induktion der Differenzierung geht mit der Induktion einer LL-37 Transkription in Kolonepithelzellen einher.**

Um zu testen, ob die Induktion der LL-37 Transkription in den Kolonepithelzellen ein spezifischer Butyrateffekt ist, wurden andere kurzkettige Fettsäuren (SCFA) und verschiedene Faktoren, die regulär im Kolonlumen vorkommen, getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von SW620 Zellen mit Isobutyrat und Propionat zu einer signifikanten Induktion der LL-37 Transkription nach 24 Stunden führt. Werden die Zellen für 48 Stunden inkubiert, resultierte daraus keine weitere LL-37 Induktion. Äquivalente Dosen (2mM) von Butyrat und Isobutyrat hatten ähnlich deutliche Effekte. Flavon (150µM) induzierte einen Anstieg der LL-37 Transkription in SW620 Kolonzellen nach 24 Stunden, wohingegen nach 48-stündiger Inkubation keine weitere Induktion zu beobachten war (Abbildung 15). Der synthetische Histondeacetylase-Hemmer Trichostatin A induzierte die LL-37 Transkription in SW620 Kolonzellen nach 24 und nach 48 Stunden. Im Vergleich waren Trichostatin A, Propionat, Butyrat (2mM) und Isobutyrat gleichwertig effektiv, jedoch waren alle diese Substrate weniger wirkungsvoll als Butyrat (4mM) nach 48 Stunden (Abbildung 15).

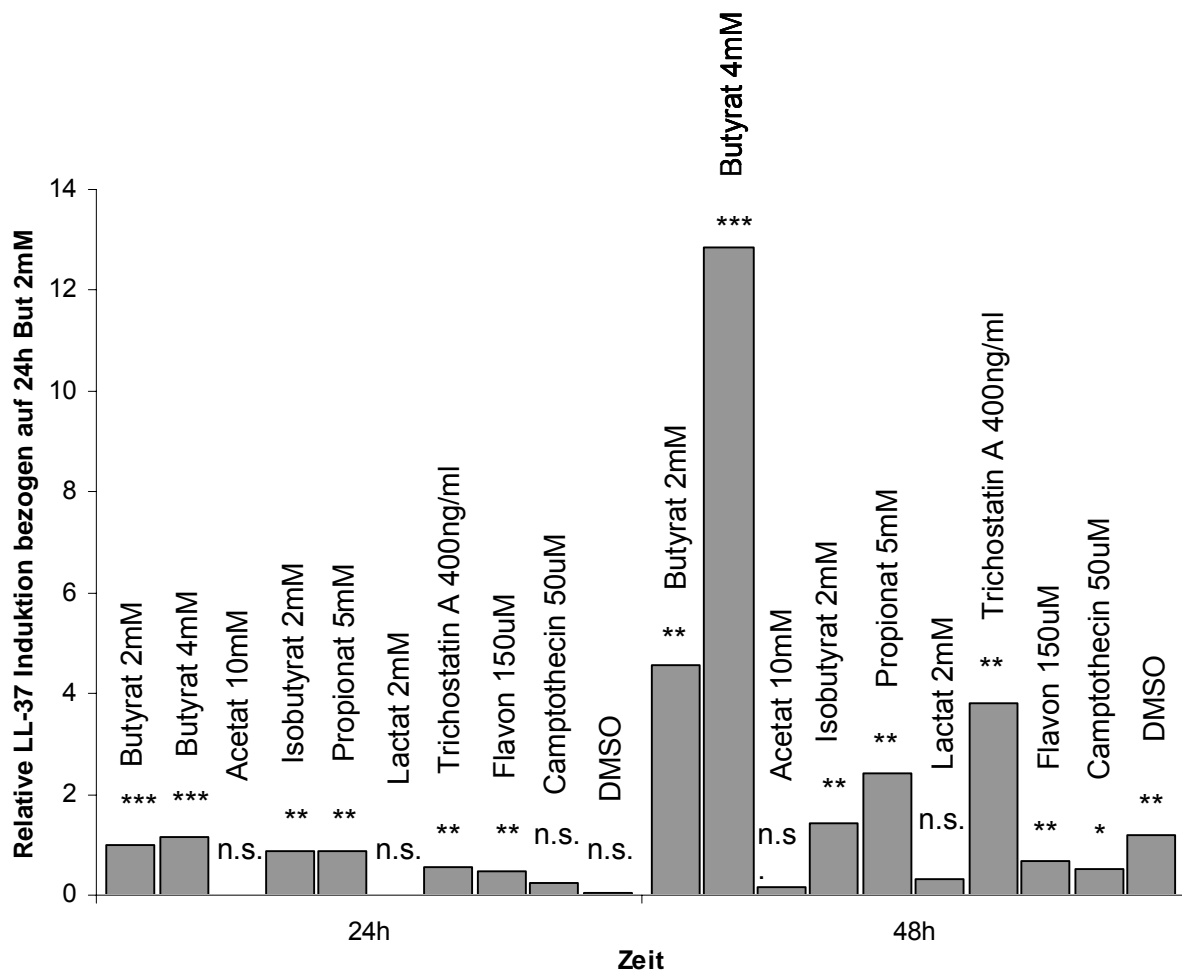


Abbildung 15: Vergleich der Induktion der Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in SW620 Kolonepithelzellen durch luminale Faktoren. Zellen wurden mit verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren unterschiedlicher Konzentrationen, Laktat, Flavon, Trichostatin A und Camptothecin bis zu 48 Stunden inkubiert. Die LL-37 Expression wurde durch quantitative Real-Time RT-PCR analysiert und die Werte beziehen sich auf 24-stündige Butyratbehandlung mit 2mM. Werte sind gemittelt+ SD (n.s.: nicht signifikant; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Die Inkubation mit der kurzkettigen Fettsäure Acetat (5mM) bis zu 48 Stunden wirkte sich nicht auf die LL-37 Expression in den untersuchten Kolonzelllinien aus. Ebenfalls wurde keine Induktion der LL-37 Transkription nach einer 48-stündigen Inkubationsperiode mit Laktat (2mM) beobachtet (Abbildung 15). Eine bis zu 48 Stunden dauernde Stimulation mit Flavon (150 $\mu$ M), einem Pflanzenfarbstoff, der mit der Nahrung in den Körper gelangt und als Redoxsystem, Wasserstoff-Akzeptor und Schutzstoff gegen Autoxidation von Vitamin C und Adrenalin für wichtig gehalten wird, veränderte die LL-37 mRNA Transkription nicht. Ebenso wenig Einfluss auf die LL-37 Transkription hatte die 24- und 48-stündige Inkubation der Zellen mit 50 $\mu$ M Camptothecin, dem einzig bekannten natürlich vorkommenden DNA Topoisomerase-1 Inhibitor (Abbildung 15).

In den Differenzierungsuntersuchungen zeigte die Inkubation mit Isobutyrat und Propionat eine erhöhte AP Aktivität in SW620 Zellen nach 24 und nach 48 Stunden (Abbildung 16). Der Effekt beider Substrate jedoch war signifikant geringer ausgeprägt als der des Butyrats ( $p < 0.001$ ). Trotz des signifikanten Effekts auf die LL-37 mRNA Expression resultierte die Inkubation mit Flavon (25-150  $\mu\text{M}$ ) nicht in einem signifikanten Anstieg der AP Aktivität auch nach 48 Stunden in SW620 Zellen (Abbildung 16). Weder 5mM Acetat noch 2mM Laktat induzierte die Differenzierung in den untersuchten Zelllinien (Abbildung 16).

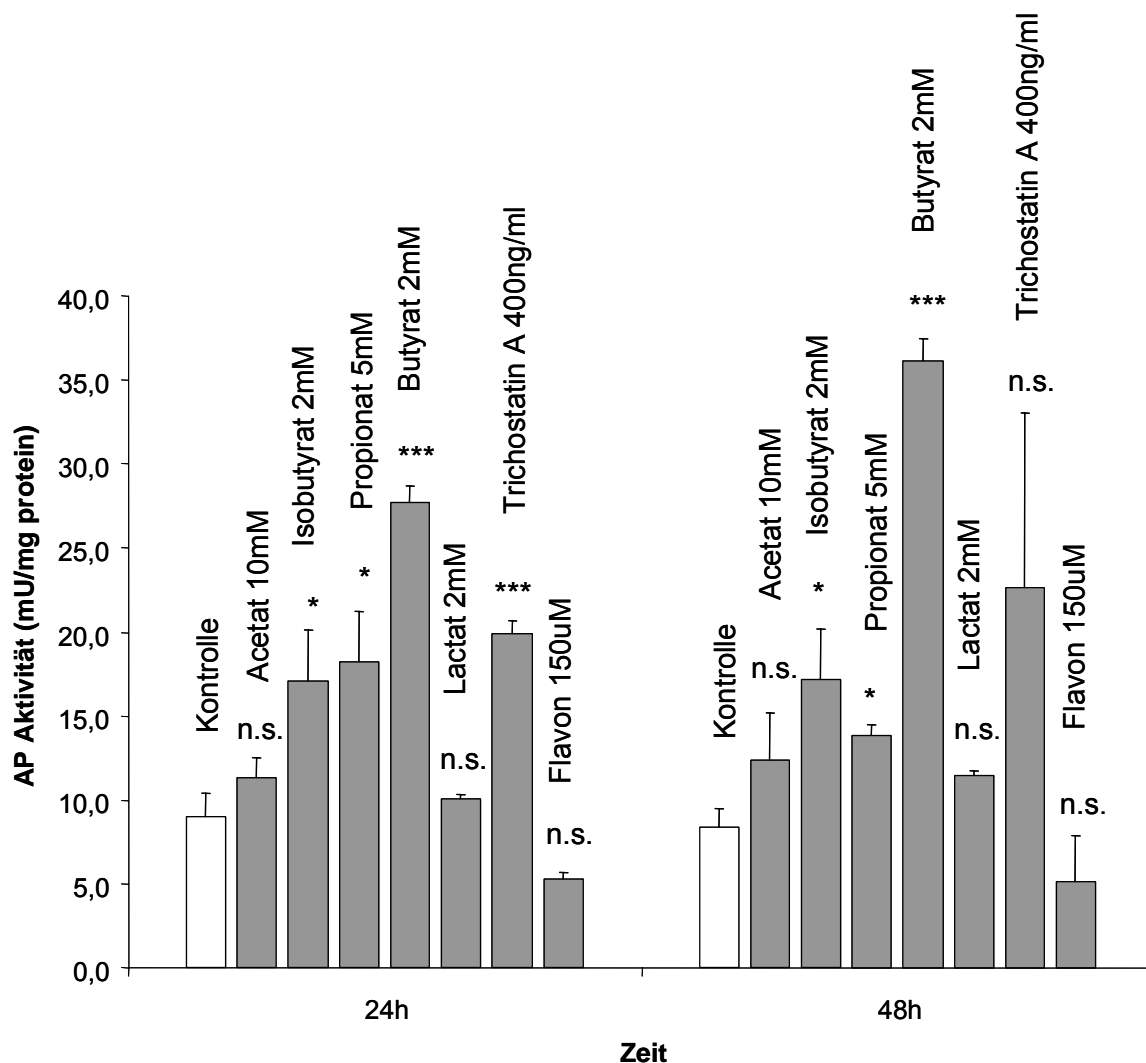


Abbildung 16: Effekte einer Auswahl luminaler Faktoren auf die AP-Aktivität. SW620 Zellen wurden mit kurzkettigen Fettsäuren unterschiedlicher Konzentration, Laktat, Flavon und Trichostatin A bis 48 Stunden inkubiert und anschließend die AP-Aktivität gemessen. Die Werte sind in mU der AP-Aktivität pro mg zellulärem Protein gemessen und sind Mittelwerte + SD (n.s.: nicht signifikant; \*:  $p < 0,1$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ )

Der synthetische Histondeacetylase-Hemmer Trichostatin A induzierte wie die LL-37 Transkription auch die Differenzierung in SW620 Kolonzenellen nach 24 und nach 48 Stunden, wobei die Induktion nach 48 Stunden jedoch nicht signifikant war (Abbildung 16).

### 3.3 Die LL-37 Induktion geht nicht mit einer Apoptoseinduktion in den Kolonepithelzellen einher.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Induktion der LL-37 Transkription durch potente Apoptoseinduktoren wie Butyrat oder Flavon mit der Apoptose der Epithelzellen vergesellschaftet ist, wurden Analysen durchgeführt, um den Anteil der apoptotischen Zellen innerhalb der analysierten, adhärent wachsenden Zellfraktion zu bestimmen (Abbildung 17).

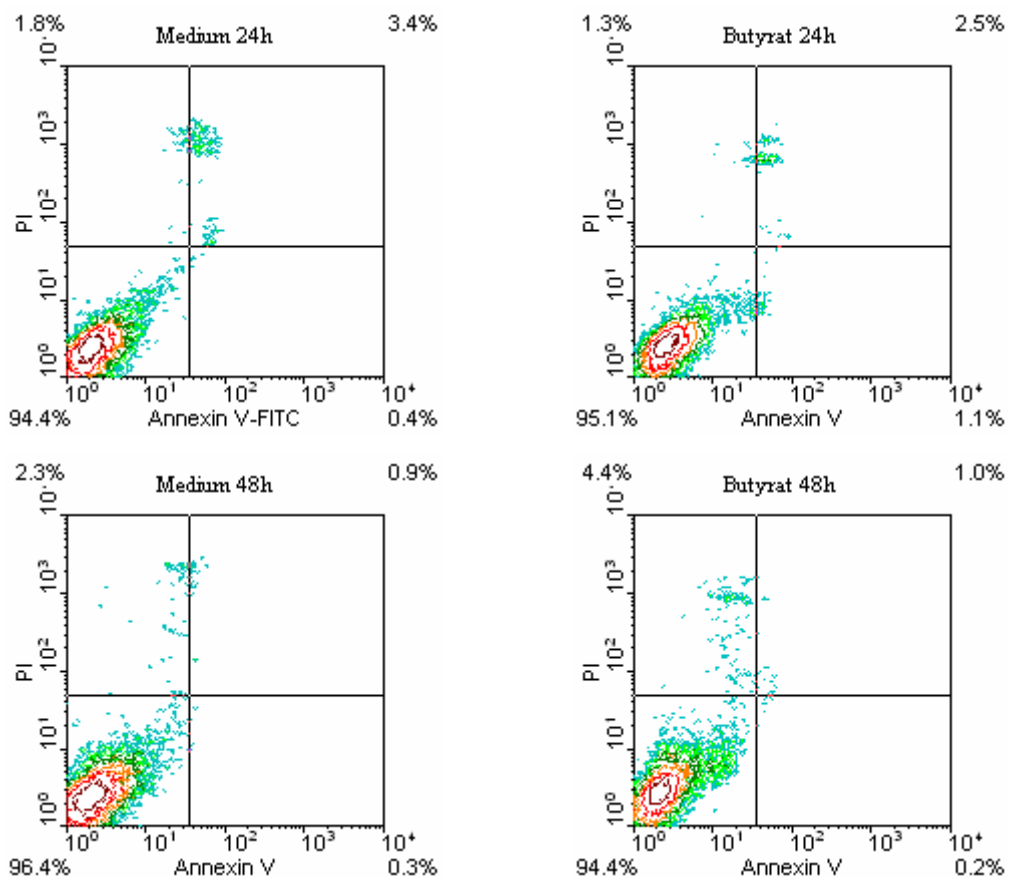
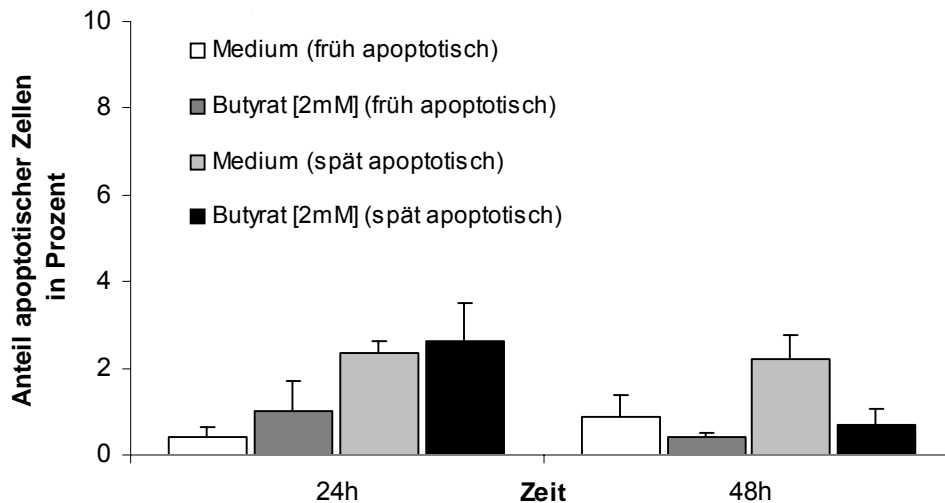


Abbildung 17: Bestimmung der apoptotischen SW620 Zellen in der FACS-Analyse. Auf der linken Seite stellen sich die Zellen der Mediumkontrollen (oben nach 24 Stunden und unten nach 48 Stunden) und auf der rechten Seite Zellen nach 2mM Butyratinkubation dar (oben nach 24 Stunden und unten nach 48 Stunden).

FACS-Analysen offenbarten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der mit Butyrat behandelten SW620 Zellen und denen der Mediumkontrolle (Abbildung 18). Nach 24 Stunden Butyratbehandlung waren im Durchschnitt 1% SW620 Zellen positiv für Annexin V und negativ für Propidium Iod als Zeichen für frühe Apoptose verglichen mit 0,4% in der Mediumkontrolle. Eine positive Färbung für Propidium Iod und Annexin V (späte Apoptose) zeigten 2,6% der mit Butyrat behandelten Zellen und 2,3% der Zellen der Mediumkontrolle

nach 24 Stunden. Jeweils zwischen Butyratbehandlung und Behandlung nur mit Medium als Kontrolle war nach 48 Stunden kein Unterschied bei der frühen (0,4% (Butyrat) vs. 0,8% (Medium)) und späten Apoptose (0,7% vs. 2,3%) feststellbar (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Graphische Darstellung der Anzahl apoptotischer SW620 Zellen in der FACS-Analyse nach 24 Stunden und 48 Stunden Inkubation einer 2mM Butyratlösung. Werte sind Mittelwerte+ SD (alle Daten nicht signifikant).

Außerdem konnte kein relevanter Unterschied in der Anzahl der früh- oder spätapoptotischen Zellen festgestellt werden, wenn flavonbehandelte und nur mit Kontrolle behandelte SW620 Zellen verglichen werden. Ähnliche Resultate ergab die Auswertung nach 48 Stunden (Daten nicht gezeigt).

In HT-29 Zellen waren nach 24 Stunden Butyratbehandlung im Durchschnitt 0,1% der Zellen früh apoptotisch verglichen mit 0,3% in der Mediumkontrolle und spät apoptotisch zeigten sich 0,2% der mit Butyrat behandelten Zellen und 1,5% der Zellen der Mediumkontrolle nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden war kein Unterschied jeweils zwischen Butyratbehandlung und Behandlung nur mit Medium als Kontrolle bei der frühen (0,1% (Butyrat) vs. 0,1% (Medium)) und späten Apoptose (0,8% vs. 0,9%) feststellbar (Abbildung 19).



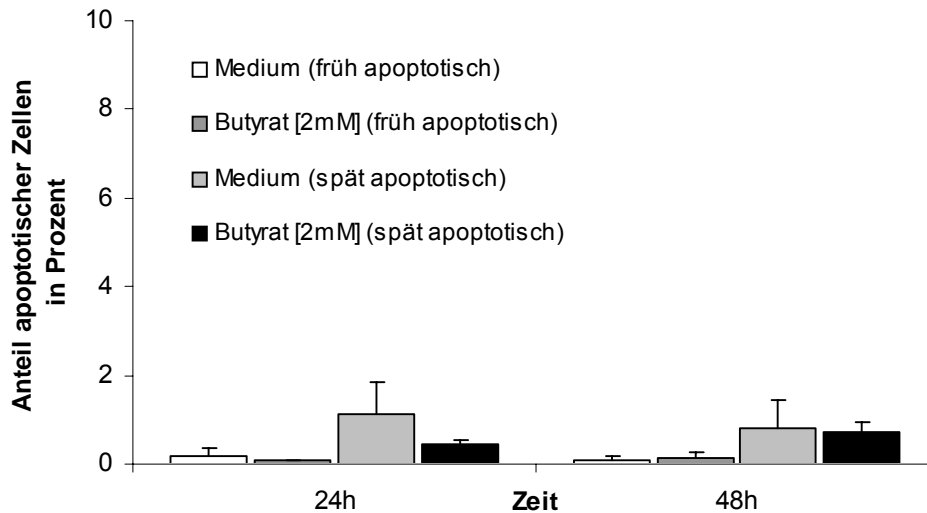


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Anzahl apoptotischer Zellen der Zelllinie HT-29 aus der FACS-Analyse, die mit 2mM Butyrat 24 Stunden und 48 Stunden behandelt wurden. Werte sind gemittelt+ SD (alle Daten nicht signifikant).

Die Inkubation mit 25-100 $\mu$ M Flavon führte zu keiner signifikanten späten Apoptoseinduktion in HT-29 Kolonzellen nach 24 Stunden oder 48 Stunden im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abbildung 20). Dahingegen wurde eine frühe Apoptose nach 24 Stunden in durchschnittlich 9,1% und nach 48 Stunden in 5,5% der Fälle in der adhären wachsenden Fraktion bei HT-29 Zellen festgestellt, was eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung gegenüber der Kontrollgruppe (nach 24 Stunden 2,8% und nach 48 Stunden 2,2%) war (Abbildung 20).

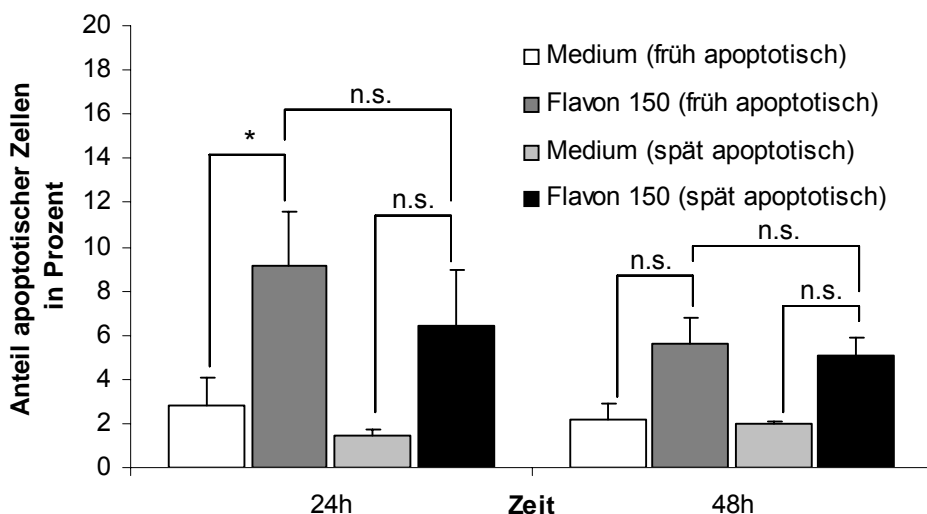
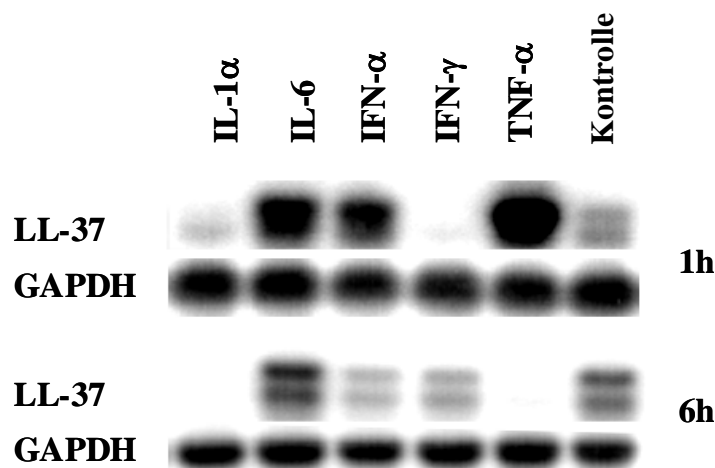


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Anzahl apoptotischer Zellen der Zelllinie HT-29 aus der FACS-Analyse, die mit Flavon 150 $\mu$ g/ml bis zu 48 Stunden inkubiert wurden. Werte sind Mittelwerte+ SD (\*:  $p < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant).

TUNEL Untersuchungen, die für die Aufdeckung der späten Apoptose benutzt werden, untermauerten alle gewonnenen Ergebnisse und zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Butyrat-behandelten und unbehandelten Zellen bei beiden untersuchten Zelllinien.

### 3.4 Eine Zytokinstimulation mit oder ohne Butyratvorbehandlung hat keinen Einfluss auf die LL-37 Expression in Kolonozyten.

Als nächstes untersuchten wir, ob eine unterschiedlich lange Stimulation mit Entzündungsmediatoren einen Einfluss auf die LL-37 Expression in Kolonepithelzellen ausüben könnte. RNA wurde extrahiert und mit einer semiquantitativen RT-PCR analysiert. Erste Ergebnisse in HT-29 Kolonepithelzellen wiesen auf eine Induktion von LL-37 durch IL-6, INF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  nach einer Stunde (Abbildung 21) und zusätzlich durch INF- $\gamma$  nach 6 Stunden hin (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Einfluss unterschiedlicher Zytokine auf die LL-37 Expression in HT-29 Kolonepithelzellen. Die Zelllinie wurde mit Interleukin-1 und -6, Interferon- $\alpha$  und - $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  bis zu 6 Stunden inkubiert. Die LL-37 Expression wurde durch Southern Hybridisierung einer RT-PCR dargestellt. Die Angleichung der cDNA-Templates erfolgte durch eine semiquantitative PCR auf das Housekeeping Gen GAPDH (unten). Die gleiche Menge cDNA wurde auch bei dem Zielgen LL-37 benutzt (oben).

In der quantitativen Real-Time RT-PCR konnten die Ergebnisse aus der semiquantitativen RT-PCR nicht bestätigt werden: Die Stimulierung von HT-29 Kolonzellen mit entzündungsfördernden Zytokinen, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bis zu 6 Stunden hatte keinerlei Effekt auf die LL-37 mRNA Transkription (Abbildung 22).

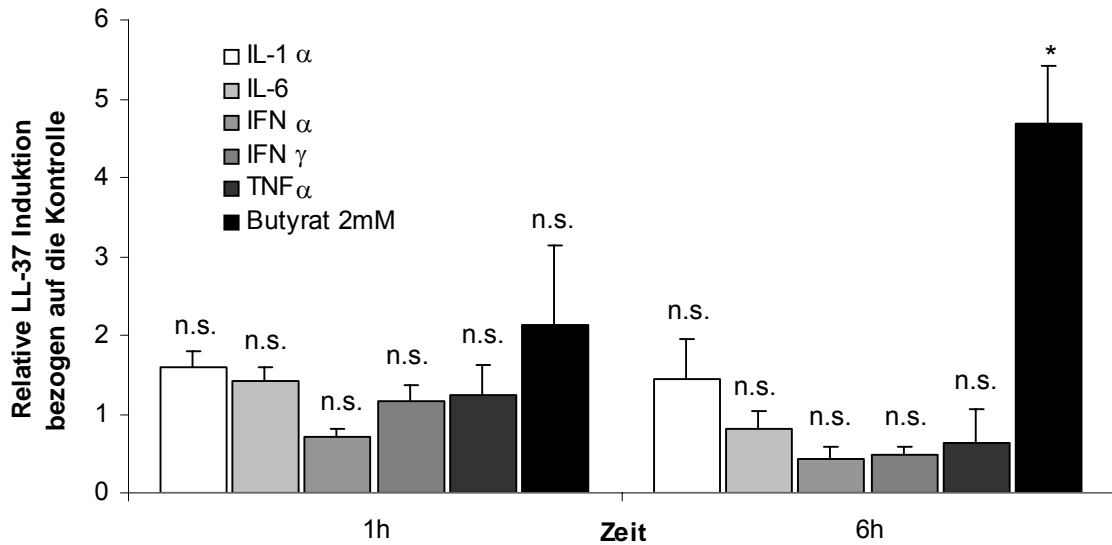


Abbildung 22: Einfluss unterschiedlicher Zytokine auf die LL-37 Expression in HT-29 Kolonzellen. Die Zelllinie wurde mit Interleukinen, Interferonen und TNF $\alpha$  bis zu 6 Stunden inkubiert oder vergleichsweise mit 2mM Butyrat behandelt. Die LL-37 Expression wurde mittels Real-Time RT-PCR analysiert. Werte sind bezogen auf unbehandelte Kontrollen und sind Mittelwerte. Die Unterschiede sind im Gegensatz zur Butyratstimulation (\*: p<0,05) nicht signifikant (n.s.).

Auch in SW620 Kolonepithelzellen hatte eine Stimulation mit TNF- $\alpha$ , LPS oder PMA, einem Abbauprodukt während einer Entzündungsreaktion, keinen Effekt auf die LL-37 mRNA Expression (Abbildung 23).

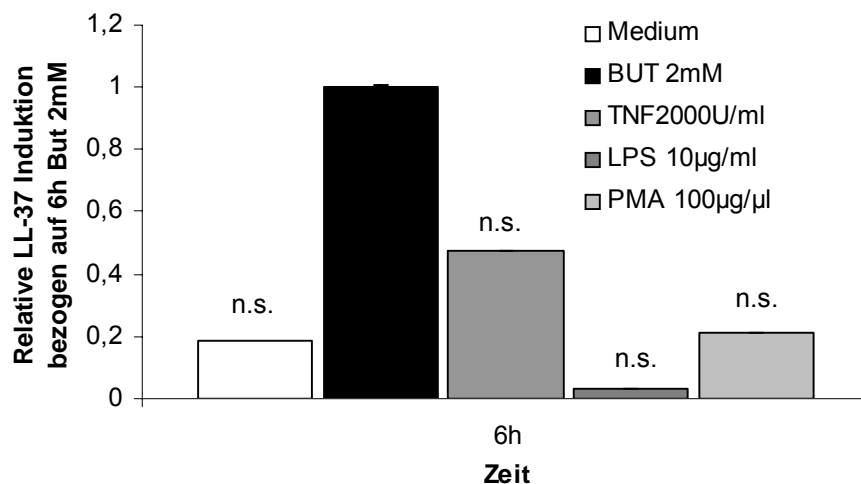


Abbildung 23: LL-37 Expression in SW620 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit entzündungsfördernden Mediatoren TNF $\alpha$ , LPS oder PMA. Die LL-37 mRNA Expression wurde mit Hilfe der Real-Time RT-PCR bestimmt. Daten sind Mittelwerte+ SD und jeweils auf 6-stündige Butyratbehandlung mit 2mM bezogen. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Als nächstes wurde untersucht, ob eine Koinkubation mit dem sicher die LL-37 Expression stimulierenden Butyrat und dem entzündungsfördernden TNF- $\alpha$  einen im Gegensatz zu den Einzelsubstanzen divergierenden Effekt auf die LL-37 Expression hat. Dazu wurde die Kolonepithelzelllinie SW620 24 Stunden mit Butyrat 4mM inkubiert und anschließend für maximal 60 Minuten noch zusätzlich mit TNF- $\alpha$  behandelt und mittels quantitativer Real-Time RT-PCR ausgewertet: Diese TNF $\alpha$  Stimulation hatte keinen Effekt auf die Butyrat-induzierte LL-37 mRNA Expression in SW620 Kolonzellen (Abbildung 24).

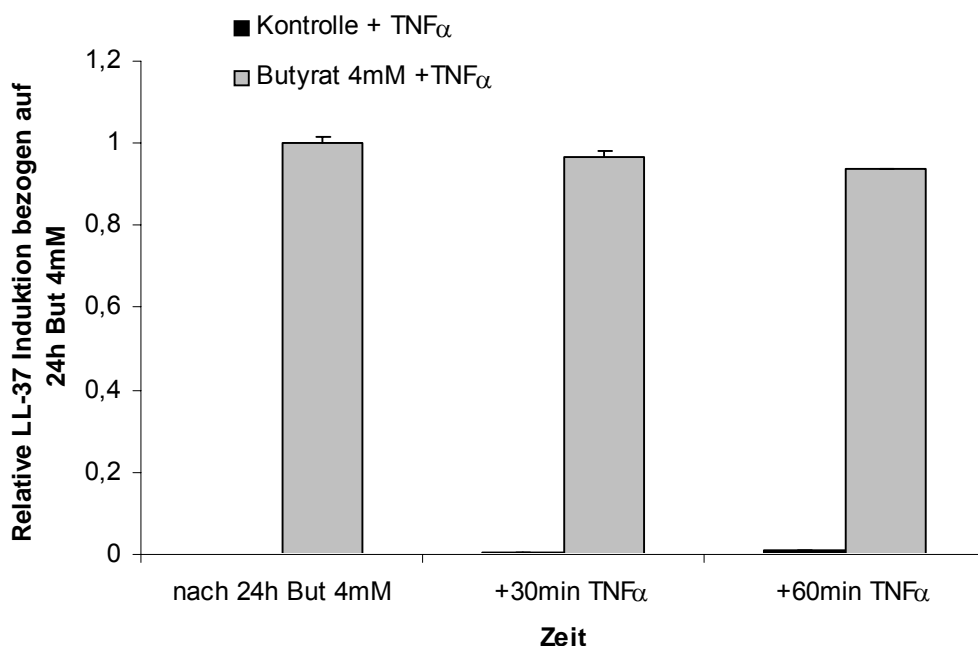


Abbildung 24: Koinkubation von Butyrat 4mM und TNF $\alpha$  (30 und 60 Minuten) auf SW620 Zellen. Die Expression von LL-37 wurde mit Real-Time PCR analysiert und auf die 24-stündige Butyratbehandlung mit 4mM bezogen. Werte stellen Mittelwerte + SD dar und sind nicht signifikant.

### 3.5 Induktion der LL-37 Expression durch Butyrat in Primärkulturen kolorektaler Tumoren.

Um herauszufinden, ob Butyrat die LL-37 Transkription in frisch isolierten Kolonepithelzellen induziert, wurden Proben von vier Patienten mit einem kolorektalen Karzinom untersucht. In Kurzzeitkulturen aus diesen frisch isolierten kolorektalen Tumorzellen und normalen Epithelzellen zeigte eine 24-stündige Butyratinkubation eine deutliche Induktion der LL-37 Transkription in der Tumorzellfraktion (Abbildung 25).

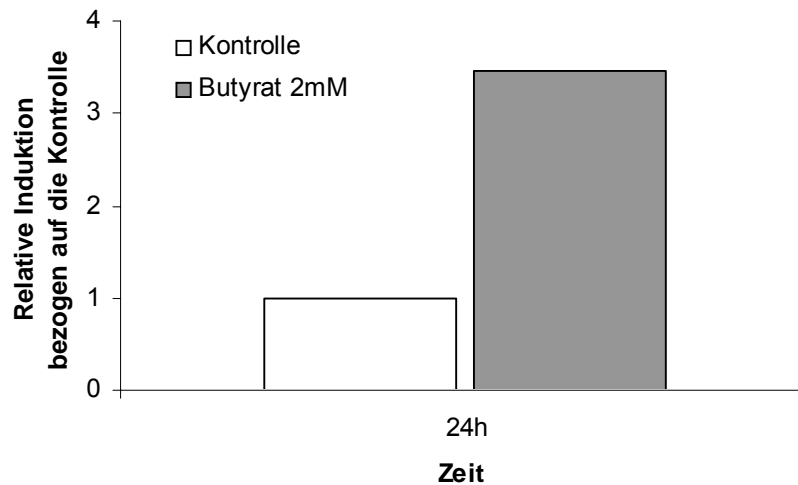
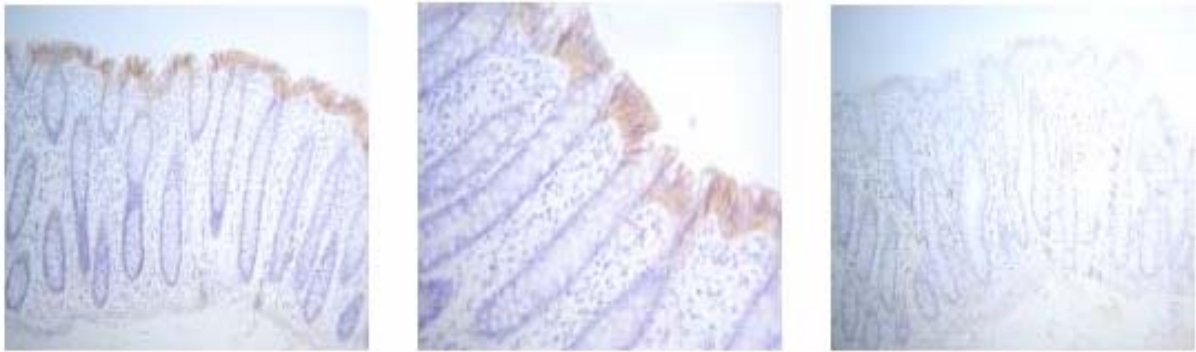


Abbildung 25: Induktion der LL-37 Transkription in Primärkulturen aus Zellen kolorektaler Tumoren, die 24 Stunden mit 2mM Butyrat inkubiert und relativ zur nur mit Medium behandelten Kontrolle gesetzt wurden.

In isolierten normalen Epithelzellen wurden keine LL-37 Transkripte nachgewiesen. Als Grund hierfür kann gelten, dass nur eine sehr geringe Menge isolierter RNA aus den Kulturen der normalen Epithelzellen nach 48-stündiger Inkubation vorhanden war.

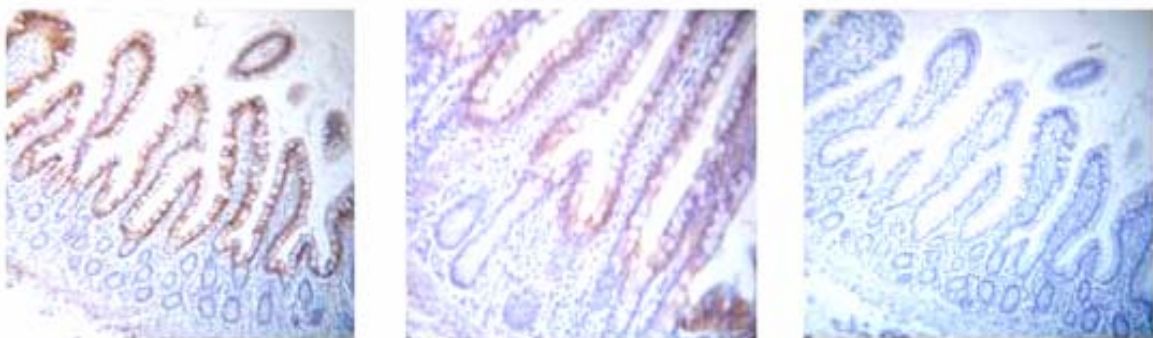
### **3.6 Differenzierte Epithelzellen der Darmschleimhaut in Kolon und Ileum exprimieren LL-37.**

Um das Expressionsmuster von LL-37 im unteren Gastrointestinaltrakt zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte aus dem erwachsenen nicht entzündeten menschlichen Kolon und Ileum immunhistochemisch mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper gefärbt. Einheitlich für die untersuchten Gewebeabschnitte aus normaler menschlicher Dickdarmschleimhaut (Kolon) ist das Peptid LL-37 am Grund der Krypten intrazellulär nicht nachweisbar, wohingegen das differenzierte Oberflächenepithel der Kryptenspitze kräftig gefärbt ist (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Die Expression des Peptids LL-37 in Epithelzellen aus dem menschlichen Kolon. Die LL-37 Expression wurde in kolorektalen Biopsien von Gesunden durch das Färben von Serienschnitten mit dem polyklonalen Antikörper für LL-37 untersucht. Die dargestellten Schnitte sind 100-fach (linkes Bild) und 250-fach (Mitte) vergrößert. Als Negativkontrolle wurde der erste Antikörper mit dem synthetischen LL-37 Peptid vorabsorbiert (rechtes Bild).

Immunhistochemische Analysen der LL-37 Peptidexpression im menschlichen distalen Dünndarm (Ileum) ergaben ein ähnliches Färbungsmuster: Die LL-37 Peptidexpression war vorwiegend im Oberflächenepithel der Zotten zu finden und nur schwach oder überhaupt nicht im tiefer gelegenen Kryptenepithel detektierbar (Abbildung 27).



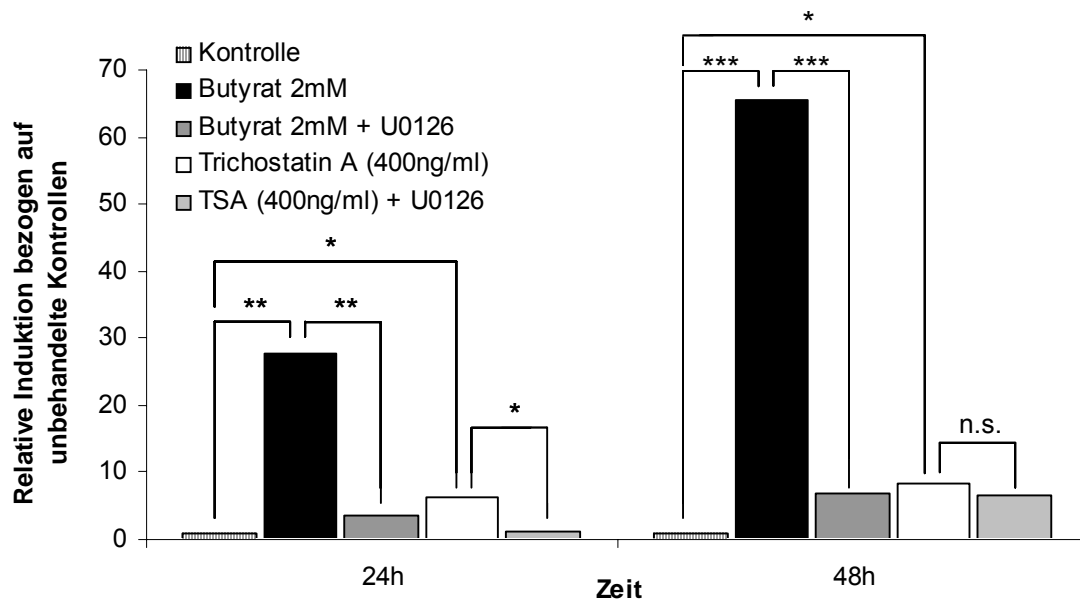
**Abbildung 27:** Die Expression des LL-37-Peptids in Epithelzellen des menschlichen Ileums. Die LL-37 Expression wurde in Biopsien aus dem Ileum von Gesunden durch das Färben von Serienschnitten mit dem polyklonalen Antikörper für LL-37 untersucht. Die dargestellten Schnitte sind 100-fach (linkes Bild) und 250-fach (Mitte) vergrößert. Als Negativkontrolle wurde der erste Antikörper mit dem synthetischen LL-37 Peptid vorabsorbiert (rechtes Bild).

### **3.7 Butyrat und Trichostatin A induzieren Differenzierung und LL-37 mRNA**

#### **Expression in Kolonepithelzellen über eine Modulation intrazellulärer Signalwege.**

Um zu klären, ob die Butyrat-regulierte Expression der LL-37 mRNA und die Zelldifferenzierung über die selben Signaltransduktionswege reguliert werden, wurden Studien mit dem spezifischen MEK 1-Inhibitor UO126 und dem p38/MAP-Kinase Inhibitor SB203580 durchgeführt: In HT-29 Zellen wurde die Butyrat-induzierte LL-37 Transkription

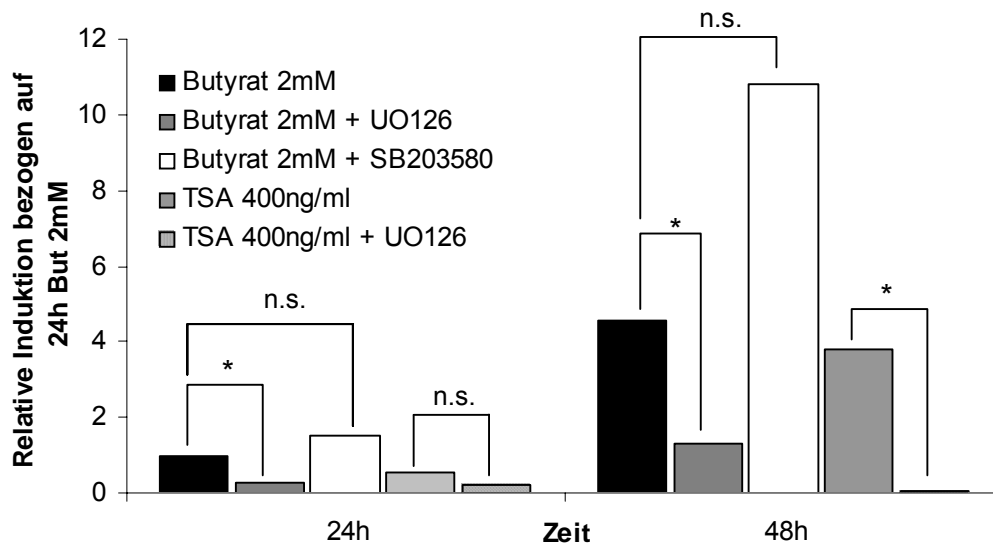
teilweise durch UO126 geblockt. Eine Butyratinkubation mit 2mM für 24 Stunden führte zu einem 20-fachen und nach 48 Stunden zu einem 65-fachen Anstieg der LL-37 Transkription verglichen mit den in der Mediumkontrolle inkubierten HT-29 Zellen (Abbildung 28). Die Vorinkubation mit UO126 blockte den durch Butyrat induzierten Anstieg der LL-37 Transkription gänzlich nach 24 Stunden ( $p=0,002$ ) und 48 Stunden ( $p=0,0004$ ) (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Der Effekt des spezifischen MEK-ERK Inhibitors UO126 auf die durch Butyrat oder Trichostatin A induzierte Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37. HT-29 Zellen wurden bis zu 48 Stunden mit 2mM Butyrat oder 400ng/ml Trichostatin A behandelt, nachdem sie zuvor 30 Minuten mit dem MEK Inhibitor UO126 inkubiert worden waren. Anschließend wurde die LL-37 Expression durch quantitative Real-Time RT-PCR analysiert (n.s.: nicht signifikant; \*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ ).

Auch eine Inkubation mit Trichostatin A (400ng/ml) führte nach 24 Stunden zu einem 6-fachen und nach 48 Stunden zu einem mehr als 8-fachen Anstieg der LL-37 Transkription verglichen mit den in der Mediumkontrolle inkubierten HT-29 Zellen (Abbildung 28). Genau wie bei Butyrat blockte die Vorinkubation mit UO126 den induzierten Anstieg der LL-37 Transkription nach 24 Stunden ( $p=0,02$ ), nach 48 Stunden war dieser Effekt jedoch nicht signifikant (Abbildung 28).

Diese Beobachtungen wurden mit SW620 Kolonzellen bestätigt: In SW620 Zellen wurde die Butyrat-induzierte LL-37 Transkription teilweise durch UO126 geblockt (Abbildung 29). Zusätzlich wurde der durch Trichostatin A induzierte Anstieg der LL-37 mRNA Transkription durch die Hemmung von MEK-ERK geblockt (Abbildung 29).

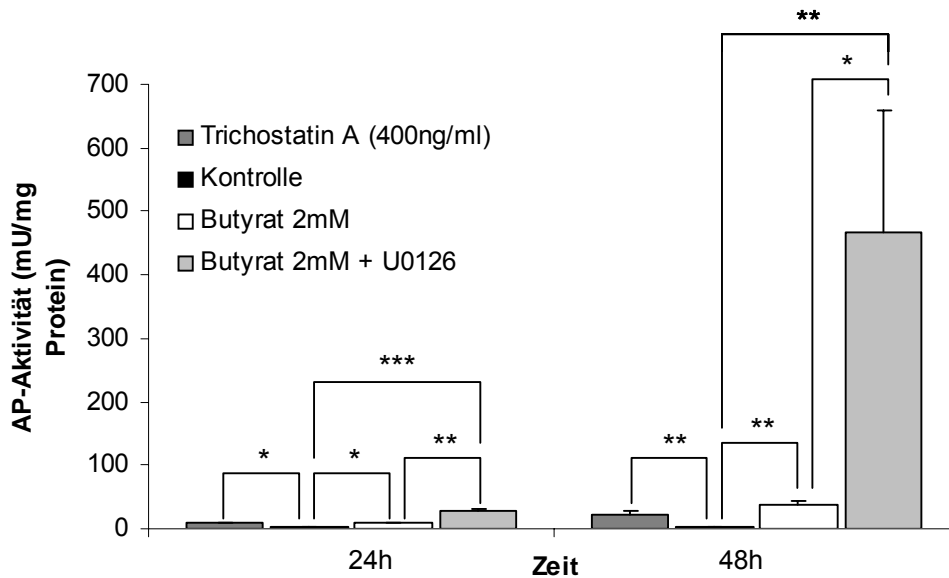


**Abbildung 29:** Der Effekt des spezifischen MEK-ERK-Inhibitors UO126 und des p38/MAP Kinase Inhibitors SB203580 auf die durch Butyrat induzierte Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in SW620 Zellen. Diese wurden mit Butyrat oder Trichostatin A behandelt, nachdem sie zuvor mit oder ohne den MEK Inhibitor UO126 oder den p38/MAP Kinase Inhibitor SB203580 inkubiert worden waren. Anschließend wurde die LL-37 Expression durch quantitative Real-Time RT-PCR analysiert (n.s.: nicht signifikant, \*:  $p < 0,05$ ).

Eine Blockierung des p38/MAP-Kinase Signalwegs mit SB203580 hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Butyrat-induzierte LL-37 Transkription in SW620 Zellen: Die LL-37 Induktion wurde nach 24 Stunden nicht beeinflusst, nach 48 Stunden jedoch wurde ein eher verstärkender Effekt beobachtet. Beides war jedoch nicht signifikant (Abbildung 29).

Im Gegensatz zur Induktion von LL-37 steigerte die MEK-ERK-Blockade mit UO126 in HT-29 Kolonzellen die Butyrat-vermittelte Differenzierung nach 24 Stunden um den Faktor 3,5 und über 12-fach nach 48 Stunden jeweils verglichen mit alleiniger Butyratbehandlung (Abbildung 30). Die Butyratinkubation mit 2mM für 24 Stunden selbst steigerte die Zelldifferenzierung im Vergleich zur Kontrolle im Mittel um das 4-fache (nach 48 Stunden um den Faktor 15,5) (Abbildung 30). Nach 24-stündiger Inkubation mit dem synthetisch hergestellten Histondeacetylase-Hemmer Trichostatin A war die AP Aktivität in HT-29 Zellen ebenfalls 4-fach und nach 48 Stunden um den Faktor 11 im Vergleich zur Kontrolle gestiegen (Abbildung 30).

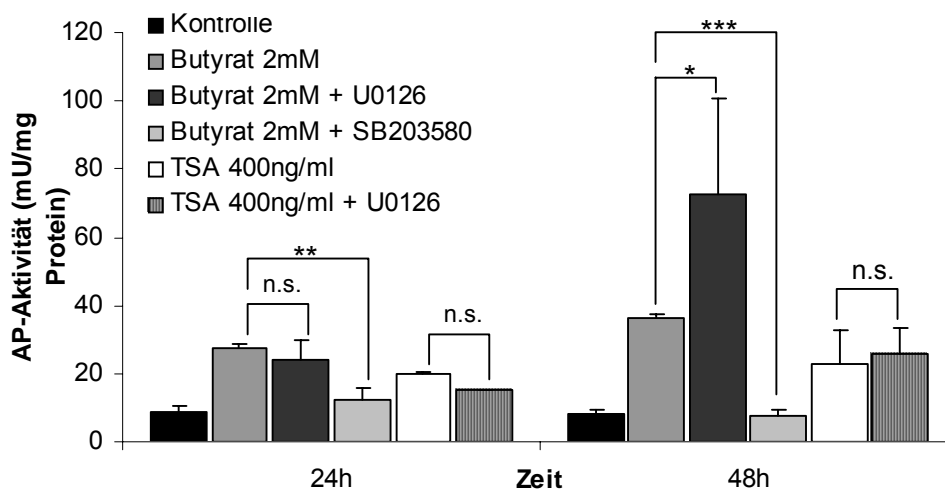




**Abbildung 30:** Der Effekt von Butyrat (2mM) allein (weißer Balken) oder mit spezifischen MEK-ERK Inhibitor UO126 (hellgrauer Balken) und 400ng/ml Trichostatin A (dunkelgrauer Balken) auf die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität in HT-29 Kolonepithelzellen. Die Zellen wurden bis zu 48 Stunden inkubiert. Die Werte sind in mU der AP-Aktivität pro mg zellulärem Protein und als Mittelwerte + SD dargestellt (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ )

Gleichwertige Ergebnisse konnten mit SW620 Kolonzellen erzielt werden: Eine 30-minütige Vorinkubation mit dem spezifischen MEK-ERK-Inhibitor UO126 steigerte auch hier die erwartete Butyrat-induzierte Zelldifferenzierung im Vergleich zur Kontrolle noch einmal klar, wobei dieser Effekt nach 48 Stunden erst signifikant war (Abbildung 31). Wie in HT-29 Kolonepithelzellen waren auch SW620 Zellen durch Trichostatin A-Behandlung differenzierter als unbehandelte Kontrollen; jedoch war der Effekt nicht so ausgeprägt wie der unter Butyratbehandlung. Eine Vorbehandlung mit UO126 vor der Trichostatinbehandlung hatte keinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung in SW620 Zellen (Abbildung 31).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde die Butyrat-vermittelte Differenzierung in SW620 Zellen durch SB203580 sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden total geblockt (Abbildung 31).

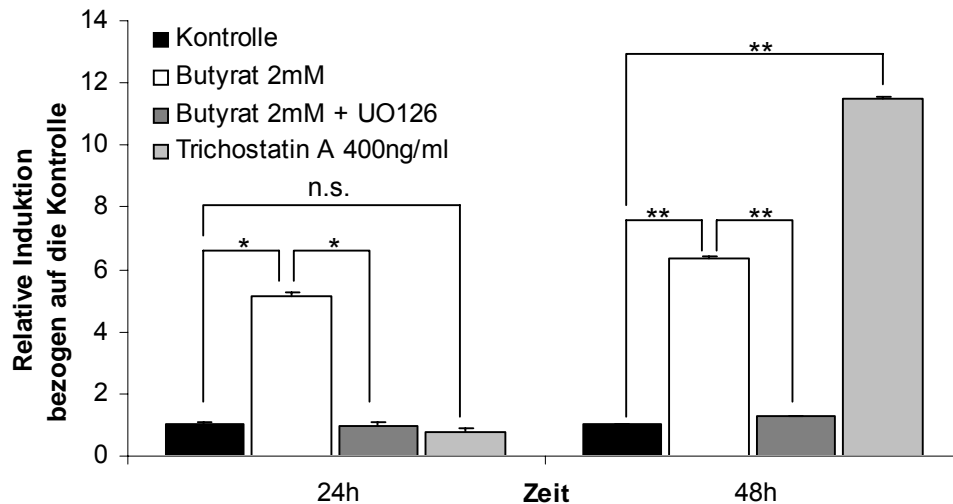


**Abbildung 31:** Effekt spezifischer Kinase-Inhibitoren auf die durch Butyrat induzierte Zelldifferenzierung. SW620 Zellen wurden mit Butyrat oder Trichostatin A behandelt, nachdem sie zuvor mit oder ohne den MEK Inhibitor UO126 oder den p38/MAP Kinase Inhibitor SB203580 inkubiert worden waren. Hier ist der Einfluss der Inhibitoren auf die Butyrat oder Trichostatin A induzierte AP-Aktivität als Marker der Differenzierung dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte + SD und in mU der AP-Aktivität pro mg zellulärem Protein angegeben (n.s.: nicht signifikant; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

### 3.8 Die Butyrat-regulierte Expression von LL-37 in PBMC und U937 Monozyten.

Als nächstes wurde untersucht, ob der Butyrateffekt auf die LL-37 Transkription nur bei Kolonepithelzellen oder auch in anderen Zellen zu beobachten ist. Hierzu wurden die monozytäre Zelllinie U937 und die frisch isolierte PBMC aus buffy coats, die beide LL-37 exprimieren, entweder mit Butyrat oder mit Trichostatin A behandelt und die LL-37 mRNA Transkription anhand Real-Time RT-PCR analysiert.

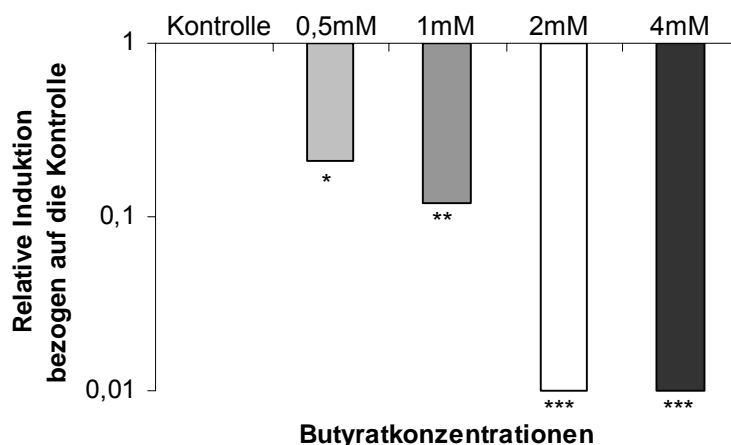
Parallel zu den Ergebnissen bei Kolonepithelzellen konnte beobachtet werden, dass auch in U937 Monozyten sowohl eine Butyrat- als auch eine Trichostatin A-Behandlung eine signifikante LL-37 Induktion auslöst, wobei der Trichostatin A-Effekt erst nach 48 Stunden zu sehen war (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Der Effekt spezifischer Kinase-Inhibitoren auf die durch Butyrat induzierte Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37. Die monozytäre Zelllinie U937 wurde mit Butyrat oder Trichostatin A behandelt, nachdem sie zuvor mit oder ohne den MEK Inhibitor UO126 inkubiert worden waren. Anschließend wurde die LL-37 Expression durch quantitative Real-Time RT-PCR analysiert und auf unbehandelte Kontrollen bezogen. Daten sind als Mittelwerte + SD dargestellt (n.s.: nicht signifikant; \*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ).

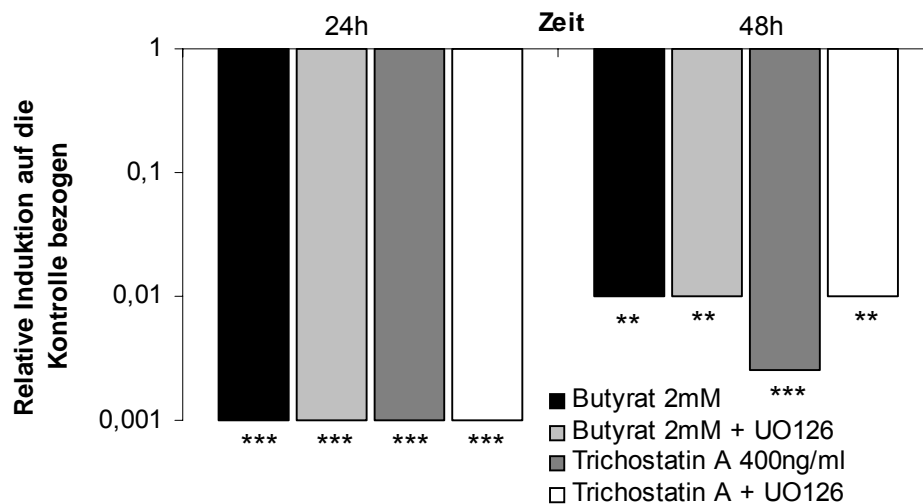
Wiederum verhinderte die Hemmung von MEK-ERK durch UO126 den durch Butyrat induzierten LL-37 Expressionsanstieg in U937 Monozyten (Abbildung 32).

Im Gegensatz zu dem LL-37 induzierenden Effekt in Kolonepithelzellen und Monozyten kam es bei unterschiedlichen Butyratkonzentrationen von 0,5mM bis 4mM zu einer dosisabhängigen Unterdrückung der LL-37 Transkription in frisch isolierten PBMC (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Unterschiedliche Butyratkonzentrationen haben nach 24 Stunden einen inhibierenden Effekt auf die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in PBMC. Schon bei einer geringen Butyratkonzentration von 0,5mM wird LL-37 signifikant herunterreguliert, wobei der Effekt bei höheren Dosen noch ausgeprägter ist. Werte aus Real-Time RT-PCR Daten sind auf unbehandelte Kontrollen bezogen und gemittelt (\*:  $p < 0,5$ ; \*\*:  $p < 0,1$ ; \*\*\*:  $p < 0,01$ ).

Zusätzlich kam es in PBMC bei einer Butyratinkubation (2mM) zu einer zeit- und dosisabhängigen Unterdrückung der LL-37 Expression (Abbildung 34) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Trichostatin A (400ng/ml) ahmte diesen Effekt nach und 48 Stunden später wurde ein dramatischer Abfall der LL-37 mRNA-Level beobachtet (Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Einfluss der differenzierungsfördernden Substanzen Butyrat oder Trichostatin A und gleichzeitiger MEK-ERK Blockade durch UO126 auf die Expression des antimikrobiellen Peptids LL37 bei PBMC. Die LL-37 Expression wird infolge einer 24-stündigen Butyrat- (2mM) oder Trichostatin A- (400ng/ml) Behandlung bei PBMC Zellen stark herunterreguliert. Unbehandelte Kontrollen sind als eins definiert. Der MEK Inhibitor UO126 hat keinerlei Einfluss auf die normalerweise durch Butyrat-/ Trichostatin A vermittelte Blockade der LL-37 Expression in PBMC. Anschließend wurde die LL-37 Expression – bezogen auf die GAPDH Expression – durch quantitative Real-Time RT-PCR analysiert und ist als relative Induktion auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die Werte sind Mittelwerte (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Experimenten mit HT-29 Kolonepithelzellen, SW620 Kolonzellen und U937 Monozyten, hatte eine Hemmung von MEK-ERK durch UO126 keinen signifikanten Einfluss auf die Butyrat- oder Trichostatin A-induzierte herunterregulierende Wirkung der LL-37 Expression in PBMC Zellen (Abbildung 34).

### 3.9 LL-37 lässt sich im WESTERN Blot nicht nachweisen.

Experimente mit Western-Blots aus dem Zellkulturüberstand und direkt aus Zelllysaten sollte zeigen, dass das antimikrobielle Peptid LL-37 auch wirklich produziert, in den Zellen in sekretorischen Vesikeln gespeichert und eventuell sezerniert wird. Aus allen Versuchen konnte das Peptid nicht im Western-Blot nachgewiesen werden.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Antimikrobielle Peptide**

Die vom Epithel exprimierten und sezernierten antimikrobiellen Peptide sind wichtige Komponenten der angeborenen Immunabwehr auf Schleimhautoberflächen (36, 37). Einige antimikrobielle Peptide – die Defensine und das Cathelicidin LL-37 – sind beim Menschen identifiziert und charakterisiert worden (3, 16, 17). Außerdem wurde die Rolle dieser antimikrobiellen Peptide unter bestimmten pathologischen Bedingungen, wie Lungenerkrankungen (32, 88), Entzündungsreaktionen der Haut (23, 31, 89) und bei Infektionen des Magen-Darm-Traktes (26, 41) untersucht. Die jeweiligen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung dieser antimikrobiellen Peptide im angeborenen Immunsystem, aber ein umfassendes Verständnis über ihre Expression und Regulation fehlt bislang noch.

Der menschliche Darm beherbergt eine Population von beinahe  $10^{14}$  Bakterien mit bis zu 500 verschiedenen Arten (90). Konsequenterweise ist eine suffiziente antimikrobielle Barriere, die die einzellige Schicht des Kolonepithels darstellt, wichtig für die angeborene Immunabwehr. Diese Schicht produziert eine Vielzahl von Immunmediatoren, unter ihnen antimikrobielle Peptide (38, 42, 91). Diese Peptide wurden vor über einer Dekade als Schlüsselregulatoren der natürlichen Flora im Gastrointestinaltrakt bezeichnet (92) und aktuelle Forschungsdaten bestätigen die Gültigkeit dieser These: Während die Expression des humanen Defensins 5 und 6 auf die Panethschen Körnerzellen im Dünndarm beschränkt ist, werden die humanen antimikrobiellen Peptide LL-37 und  $\beta$ -Defensin 1 im Wesentlichen in Kolonepithelzellen konstitutiv exprimiert (38, 39). Daneben wird das humane  $\beta$ -Defensin 2 in Epithelzellen bei Stimulation durch Entzündungsmediatoren und als Antwort auf eine bakterielle pathogene Infektion induziert (38).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des einzigen humanen antimikrobiellen Cathelicidinpeptids LL-37 in Kolonepithelzellen, Monozyten und PBMC untersucht.

### **4.2 Proliferation, Differenzierung und Apoptose**

Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) und Flavon sind gut charakterisierte Induktoren der Differenzierung in humanen kolorektalen Karzinomzellen (63, 93). Besonders die kurzkettige Fettsäure Butyrat dient als Primärsubstrat für den Stoffwechsel der Kolonozyten und hat deutliche Effekte auf die Kolonepithelzellproliferation, -differenzierung und Apoptose (50).

Es kommt in HT-29, SW620 und SW480-Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Proliferationshemmung im Vergleich zur Inkubation mit einer Kontrollsubstanz (61, 65). Gleichzeitig steigt die Expression des Enzyms alkalische Phosphatase, einem etablierten Differenzierungsmarker, in allen untersuchten Zelllinien an – begleitet durch morphologische Veränderungen der Zellen charakteristisch für einen differenzierteren Phänotyp (60, 61).

In unseren Experimenten konnten wir bei Inkubation mit Butyrat, Isobutyrat und Propionat in allen untersuchten Zelllinien einen zeit- und dosisabhängigen Anstieg der alkalischen Phosphatase im Zellkulturmedium feststellen, wobei Butyrat bekanntermaßen der stärkste Stimulator der Differenzierung war. Diese Beobachtung wurde darüber hinaus mit den Resultaten der untersuchten Adenomzelllinie ergänzt, die schon unbehandelt differenzierter als die restlichen Zelllinien war, was aufgrund der beinahe zehnfach höheren AP-Aktivität im Vergleich zu den anderen Kolonzelllinien festgestellt wurde. Diese Zellen zeigten sich relativ resistent gegenüber dem Butyrateffekt: Nur höhere Butyratkonzentrationen oder verlängerte Zellinkubationsperioden ergaben eine erhöhte AP-Aktivität.

Die im Kolonlumen physiologisch vorliegenden Butyratkonzentrationen schwanken zwischen 13mM und 19mM (48), wobei Spitzenwerte bis 40mM vorkommen können (50). Die von uns verwendeten Butyratkonzentrationen lagen zwischen 0,5mM bis maximal 4mM und damit unterhalb der physiologischen Spiegel. Dennoch kann in Kolonkarzinomzelllinien durch zum Beispiel das Fehlen einer, in vivo vorliegenden, luminalen Mukusschicht, mit einer verstärkten Butyratwirkung gerechnet werden (94). Um eine toxische Wirkung der getesteten Substanzen auf die Zellen zu vermeiden, beschränkten wir den Inkubationszeitraum in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen auf maximal 48 Stunden (94, 95).

Butyrat, Propionat, Flavon und in hohen Dosen auch TSA induzieren Apoptose in einer Vielzahl von Kolonadenom- und Kolonkarzinomzellen und ihr proapoptotischer Effekt auf Kolonzellen ist detailliert untersucht worden (59, 63, 96). Butyrat ist jedoch von den im Kolonlumen hauptsächlich vorkommenden SCFAs jene mit der stärksten pro-apoptotischen Wirkung (97). Um die Auslösung der Apoptose in unserem Zellkulturmodell zu quantifizieren, verwendeten wir ein etabliertes Verfahren: Sobald Zellen, die adhären in Zellkulturflaschen wachsen, apoptotisch werden, lösen sie sich von dem Zellkulturflaschenboden und schilfern in das Kulturmedium ab (63).

Die Zählung der Zellzahl im Zellkulturüberstand gilt als etablierte Methode der Bestimmung der Apoptoseinduktion kurzkettiger Fettsäuren (59, 94, 95, 97). Mittels eines AnnexinV Assays (82, 83) konnte zudem gezeigt werden, dass es sich bei den flotierenden Zellen um apoptotische Zellen handelt (8). Die flotierende Zellfraktion im Butyratinkubationsexperiment

zeigt eine höhere Aktivität der alkalischen Phosphatase als die adhärenzte Zellfraktion (63). Es wird angenommen, dass Kolonkarzinomzellen unter Butyratexposition zunächst differenzieren und dann apoptotisch werden (63).

Nach 24 und 48 Stunden waren die behandelten Zellen nicht mehr so vital wie zu Beginn, vor allem nach einer Trichostatin A Behandlung. Es ist bekannt, dass Trichostatin A in hohen Dosen ebenso wie Butyrat zytotoxisch wirkt. Deshalb waren auch alle GAPDH Level in diesen Experimenten niedriger; der Effekt auf die LL-37 Expression jedoch war so deutlich, dass der Butyrat effekt auf den GAPDH-Level vielleicht vernachlässigt werden kann. Um auszuschließen, dass die gesamte Wirkung der Stimulation auf die LL-37 Expression darauf beruht, dass die untersuchten Zellen schon in einem apoptotischen Stadium waren, wurden in unserem experimentellen Ansatz nur die adhärenz wachsenden Zellen untersucht. Die apoptotischen Zellen im Zellkulturmedium wurden verworfen. Es konnte tatsächlich festgestellt werden, dass nur ein kleiner Anteil der in den Analysen untersuchten Zellen apoptotisch war.

### **4.3 Immunhistochemische Färbungen**

Hase et. al. berichteten, dass die Zelldifferenzierung der entscheidende Faktor für die LL-37 Expression in Kolonepithelzellen sei (84). Dies kann vermutet werden, wenn immunhistochemische Analysen an Kolonbiopsiematerial gesunder Individuen durchgeführt werden. Die deutlichste Färbung findet sich an den Spitzen der Darmkrypten. Das könnte mit dem Recyclingmodell der Kolonepithelzellen erklärt werden: Stammzellen an der Kryptenbasis teilen sich und wandern in einem Differenzierungsprozess entlang der Krypte bis zur Epitheloberfläche, wo sie dann absterben und ins Lumen abgestoßen werden. Dabei differenzieren die Zellen (96). Die berichteten Beobachtungen im Kolon konnten wir bestätigen und dehnten sie anhand von Analysen der LL-37 Expression im distalen Dünndarm aus. Wieder exprimierten die differenzierteren Enterozyten an der Zottenspitze das LL-37 Peptid stärker, während in den Zellen in der Tiefe des Zottenepithels kein LL-37 nachweisbar war. Im proximalen Dünndarm konnte kein LL-37 Peptid nachgewiesen werden (84).

### **4.4 Effekte auf die LL-37 Expression**

Parallel zu einer erst kürzlich veröffentlichten Studie (84) konnten wir beobachten, dass, im Gegensatz zum humanen  $\beta$ -Defensin 2, Zytokine, LIF und LPS keinen eindeutigen Effekt auf

die Expression von LL-37 in Kolonepithelzellen haben. Leider waren die Unterschiede der Ergebnisse aus den Real-Time RT-PCR LL-37 Daten sehr gering ausgeprägt.

Auch eine Koinkubation mit 4mM Butyrat (24 Stunden) und TNF $\alpha$  (bis 1 Stunde) hatte keinen zusätzlichen Effekt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Entzündungsstimuli wie verschiedene Interleukine, Interferon oder TNF $\alpha$  keinen Einfluss auf die LL-37 mRNA Transkription in Kolonepithelzellen haben.

Diese Beobachtung ist insbesondere von Bedeutung, da das LL-37 kodierende Gen CAMP Bindungsstellen für die Expression des nukleären Bindungsfaktors von IL-6 (NF-IL-6) besitzt (6). Außerdem korreliert die Expression des LL-37 Vorläuferproteins hCAP-18 mit der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in der menschlichen Haut. Beides weist darauf hin, dass dieses Zytokin möglicherweise die LL-37 Expression beeinflusst (3, 25). Zusätzlich wird die LL-37 Expression in Keratinozyten während einer Entzündungsreaktion induziert (23, 25). Eine Erklärung für diese Abweichung könnte sein, dass sich die Regulation der antimikrobiellen Peptidexpression in Epithelzellen aus verschiedenen Geweben unterscheidet.

Die kurzkettigen Fettsäuren Butyrat, Isobutyrat und Propionat induzieren in den untersuchten Zelllinien die LL-37 Expression zeit- und dosisabhängig. Parallel zu den Ergebnissen der Differenzierung hatte Butyrat auch den größten Induzierungseffekt auf das LL-37 Peptid (Tabelle 1).

<b>SW620 Kolonepithelzellen</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
Butyrat 2mM	↑↑	↑↑↑
Butyrat 4mM	↑↑↑	↑↑↑
Isobutyrat 2mM	↑	↑↑
Propionat 5mM	↑	↑↑
Trichostatin A 400ng/ml	↑	↑↑
Flavon 150 $\mu$ M	↔	↑
Acetat 10mM	↔	↔
Laktat 2mM	↔	↔

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Wirkung kurzkettiger Fettsäuren auf die LL-37 Expression nach 24 Stunden und 48 Stunden in SW620 Kolonepithelzellen.

Die Inkubation von Kolonepithelzellen mit Flavon induzierte in unseren Experimenten signifikant die LL-37 Transkription, wobei Azetat und Laktat keinen Einfluss hatten.



Diese Beobachtung wurde anhand der Ergebnisse der untersuchten Adenomzelllinie ergänzt. Bei diesen differenzierteren Zellen ließen sich erst mit höheren Butyratkonzentrationen oder verlängerten Zellinkubationsperioden signifikant höhere LL-37 Expressionslevel nachweisen. Die höhere AP-Aktivität in unbehandelten Geki2 Adenomzellen korrelierte aber nicht mit einer größeren Anzahl an LL-37 mRNA-Transkripten.

Viele der Butyratauswirkungen werden der reversiblen Inhibierung von Histondeacetylasen zugeschrieben, die zur Modulation von Histon- und Nicht-Histonproteinen im Zellkern und nachfolgenden Genaktivierung oder –suppression führt. Isobutyrat, das geringere Effekte auf Histondeacetylasen ausübt, induzierte wie Butyrat die LL-37 Expression, insgesamt aber war der Effekt weniger deutlich (98). Der synthetisch hergestellte Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A vermag ebenfalls die LL-37 Transkription in den untersuchten Zellen zu induzieren. Dies lässt ebenso auf die Beteiligung dieses Mechanismus schließen.

Diese Resultate deuten unterschiedliche Signalwege auf der einen Seite für die Induktion der Gene an, die an der Differenzierung beteiligt sind, und auf der anderen Seite für die Expression der Gene, die das Peptid LL-37 codieren. Das immunhistochemische Färbemuster der LL-37 Expression im unteren Gastrointestinaltrakt impliziert, dass diese Signalwege *in vivo* gleichzeitig aktiviert sind.

#### **4.5 Signalwege**

Genauere Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Regulation und die Signalwege der Zelldifferenzierung und der LL-37 Expression zu erforschen: Der intrazelluläre Wirkmechanismus der SCFA auf Kolonzellen ist bis heute noch nicht gänzlich verstanden worden. Vor kurzem wurde entdeckt, dass die durch Butyrat induzierte Transduktion über dem MEK-ERK-Signaltransduktionsweg läuft und auch der  $G\alpha_{i2}$ -Gen Promotor beteiligt ist (99). Sie zeigten zusätzlich, dass die Sp1 Stelle diesen Effekt vermittelt. Bis jetzt konnte keine Sp1 Bindestelle im LL-37 Promotorbereich gefunden werden, es können jedoch andere Transkriptionsfaktoren in den MEK/ERK Signalweg verwickelt sein, wie zum Beispiel STAT 3, dessen Bindestelle in der LL-37 Promotorregion vorhanden ist (99).

Erst kürzlich wurde von einer anderen Forschungsgruppe postuliert, dass Butyrat den intestinalen Homeobox Transkriptionsfaktor Cdx2 in Kolonepithelzellen stimuliert (100). Cdx2 ist einer der wichtigsten Regulatoren für Proliferation, Morphogenese und die Genexpression im Darmepithel (101). Die Promotorregion von LL-37 und hCAP18 enthält eine mögliche Bindungsstelle für Cdx2 (84). Dazu kommt noch, dass das Expressionsmuster

von Cdx2 im erwachsenen menschlichen Darm das intestinale Färbemuster von LL-37 widerspiegelt: Es zeigen sich höhere Level im distalen als im proximalen Dünndarm und ein Expressionsgradient in der Krypten-/ Zottenachse, wobei Cdx2 hauptsächlich in der Zottenspitze zu finden ist (102).

Die durch Butyrat herbeigeführte Differenzierung in menschlichen Kolonepithelzellen verläuft parallel zu einer Modulation des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges (85-87). Eine Inhibierung von MEK-ERK verstärkt den differenzierenden Butyrat-effekt auf Kolonepithelzellen (85) und Blutzellen (77). In unseren Experimenten steigerte der MEK 1 Inhibitor UO126 die durch Butyrat hervorgerufene Differenzierung signifikant in den untersuchten Kolonzelllinien. Dagegen blieb die erwartete LL-37 Transkriptionsinduktion bei 30 minütiger Vorinkubation der Zellen mit UO126 aus. Das legt den Schluss nahe, dass dieser Signalweg in die Regulierung der LL-37 Transkription eingreift. Ähnlicherweise blockte UO126 die Trichostatin A induzierte LL-37 Transkription, aber nicht den Effekt von Trichostatin A auf die Differenzierung. Wurde dagegen der p38/MAP-Kinase Signalweg mit dem spezifischen Inhibitor SB203580 blockiert, so zeigte sich eine Hemmung der Differenzierung von SW620 Zellen sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden. Auf die LL-37 Transkription hatte die p38/MAPK-Blockade mit SB203580 einen divergierenden Effekt: Bei SW620 Zellen zeigte sich nach 24 Stunden keine Änderung der Transkription, wobei nach 48 Stunden eine leichte, jedoch nicht signifikante Steigerung gegenüber der Kontrolle zu beobachten war. Dies legt nahe, dass der p38/MAP-Kinase Signalweg nur einen Einfluss auf die Differenzierung der Kolonepithelzellen, nicht aber auf die Transkription des antimikrobiellen Peptids LL-37 ausübt. Abschließend lässt sich anhand dieser Resultate sagen, dass die Regulation der Differenzierung und der LL-37 Expression durch SCFA in Kolonepithelzellen nicht strikt gekoppelt sind. Signaltransduktionswege wie Ras-Raf-MEK-ERK oder p38/MAP-Kinase spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der durch SCFA regulierten Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in menschlichen Kolonzellen. Diese Signaltransduktionswege können in vivo aber sehr wohl nebeneinander ablaufen. Immunhistochemische Analysen des distalen Ileums und des Kolons lassen dies vermuten.

#### **4.6 LL-37 Expression in Monozyten**

Faktoren aus dem Darmlumen und davon speziell SCFA sind wichtig für die kolorektale Epithelphysiologie (50). Zusätzlich wurden die tiefgreifenden Effekte der SCFAs auf die natürliche Schutzfunktion des Kolonepithels und deren Entzündungsreaktion untersucht (51,

103). Weiterhin modulieren SCFA die Immunabwehr in Kolonepithelzellen als Antwort auf pathogene Bakterien und auf bestimmte Entzündungsmediatoren (104-107). Am wahrscheinlichsten wird diese Art der Regulation durch das Zusammenspiel von Immunfunktionen über den MAP-Kinase Weg in Kolonepithel- und Schleimhautimmunzellen, wie etwa dendritischen Zellen, vermittelt (106, 108). Deshalb wurden auch die Effekte von Butyrat auf die LL-37 Expression in einer undifferenzierten monozytären Zelllinie und reifen PBMC untersucht – Zellen, die von sich aus schon LL-37 Peptid exprimieren (B-Zellen,  $\gamma\delta$  T Zellen und NK Zellen). LL-37 wirkt zusätzlich zur antimikrobiellen Aktivität chemotaktisch auf polymorphkernige Granulozyten und T-Lymphozyten (22, 109).

Analog zu Versuchen mit Kolonepithelzellen führten Butyrat und Trichostatin A in unseren Experimenten zu einer verstärkten Differenzierung in der monozytären Zelllinie U937 (110, 111) und steigerten die LL-37 mRNA Expression. Dieser Effekt konnte wie schon in Kolonepithelzellen durch den MEK<sub>1/2</sub>-Hemmer UO126 blockiert werden. Im Gegensatz dazu unterdrückten Butyrat und Trichostatin A die LL-37 Expression in PBMC. Eine MEK-ERK Blockade schien dabei ohne weiteren Effekt zu sein. Diese Beobachtung ist von großem Interesse und kann als Dominanz der p38 Aktivierung über MEK/ERK in PBMC interpretiert werden. Alternativ könnte der unterschiedliche Effekt von Butyrat auf die LL-37 Expression in diesen Zellen durch Unterschiede in der Chromatinstruktur und DNA-Zugänglichkeit bedingt sein. Butyrat und Trichostatin A sind bekannte Histondeacetylaseinhibitoren, die sich auf Chromatin- und DNA-Strukturen auswirken (112).

Ein weiterer Gesichtspunkt könnte die Beobachtung von Bohmig et al. sein, dass die T-Zellfunktion bei PBMC nach einer Butyratbehandlung geringer als üblich stimuliert wird (113).

Butyrat erreicht Konzentrationen von bis zu 40mM im Darmlumen und von etwa 0,04mM im peripheren Blutstrom (50). Es ist deshalb denkbar, dass die Konzentrationen, die bei dieser Arbeit benutzt wurden, durchaus in der Schleimhaut in vivo vorkommen können, so dass ein Kontakt zwischen ausreichender Butyratkonzentration und PBMC, beziehungsweise gewebständigen Monozyten erwartet werden kann (108). Die Modulation der Immunstimulationskapazität von PBMC - wie dendritische Zellen -, die auf eine geminderte LL-37 Expression folgen könnte, kann vielleicht an den entzündungshemmenden Effekten von Butyrat auf eine bereits entzündete Kolonschleimhaut beteiligt sein (51).

## 5. Zusammenfassung

Butyrat ist die wichtigste kurzkettige Fettsäure im Kolon und dient der normalen Schleimhaut als trophischer Faktor. Butyrat hat paradoxe Effekte auf Epithelzellen des Kolons: Hauptenergieträger und Wachstumsstimulator normaler Mukosa einerseits, Proliferationshemmer und Apoptoseinduktor kolorektaler Karzinomzellen *in vitro* andererseits. Butyrat kann zudem die Immunfunktionen der Schleimhaut modulieren.

Die einzellige Schicht des Dickdarmepithels ist eine aktive Barriere gegen die intestinalen Bakterien im Kolonlumen. Zusätzlich zur Bildung einer physischen Barriere ist das Epithel mit verschiedenen Effektormolekülen ausgestattet, zu welchen auch antimikrobielle Peptide zählen. Antimikrobielle Peptide spielen eine wichtige Rolle als endogene Antibiotika in der angeborenen Immunabwehr. Es sind kleine kationische Peptide von weniger als 100 Aminosäuren Länge. Sie kommen konserviert bei Insekten, Tieren, Pflanzen und dem Menschen vor. Diese Peptide werden in Zellen des Immunsystems, aber auch in Epithelzellen exprimiert und sezerniert. Sie wirken gegen gram-positive und -negative Bakterien, Viren und Pilze. Zusätzlich zu Ihrem antimikrobiellen Effekt üben diese Peptide einen chemotaktischen Reiz auf unterschiedlichste Immunzellen aus, darunter neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und T-Zellen, stimulieren die Chemokinfreisetzung durch Monozyten, induzieren die Mastzelldegranulation und können das Komplementsystem aktivieren.

Beim Menschen sind bisher folgende AMPs beschrieben worden: Zehn Defensine (sechs  $\alpha$ -Defensine (HNP1-4, HD5-6) und vier  $\beta$ -Defensine (HBD1-4)) und das humane Cathelicidinpeptid LL-37. Letzteres war auch Gegenstand unserer Forschungen. LL-37 wird in den Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert und in Knochenmark und Hoden, sowie in Hautkeratinozyten, Lungenepithel, und Plattenepithel der Zunge, des Ösophagus, der Zervix und Vagina exprimiert.

Beachtenswerterweise ist bis heute nichts über die Konsequenzen einer gesteigerten antimikrobiellen Peptidexpression, die bedenklich für den Schutz der Schleimhaut gegenüber enteropathogenen Mikroben ist, gegenüber der physiologischen Darmflora bekannt. Eine pathologische Aktivitätssteigerung der endogenen Antibiotika würde dann für den Wirt nicht gerade vorteilhaft sein, sondern hätte vielleicht schädliche Folgen.

In dieser Arbeit wurde die Expression und Modulation des einzigen humanen antimikrobiellen Cathelicidins LL-37 durch Entzündungsmediatoren oder Ernährungsfaktoren untersucht. Die untersuchten Zytokine, darunter  $\text{TNF}\alpha$  und verschiedene proinflammatorische Interleukine ( $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ) zeigen keinen Einfluss auf die LL-37 Expression in Kolonepithelzellen. Die Expression des antimikrobiellen Peptids scheint dagegen stark mit Zelldifferenzierung verbunden zu sein. Nur differenzierte Epithelzellen im menschlichen Kolon und Ileum exprimieren LL-37 *in vivo*.

Faktoren im Kolonlumen können dagegen einen Einfluss auf die Expression von LL-37 Expression in Kolonepithelzellen ausüben. Insbesondere kurzkettige Fettsäuren, die bei der bakteriellen Fermentation unverdauter Kohlenhydrate im Kolonlumen entstehen und die eine Zelldifferenzierung herbeiführen, induzieren *in vitro* die Expression des antimikrobiellen LL-37 in verschiedenen Kolonepithelzellen. Gleichzeitig steigert Butyrat die Differenzierung in den untersuchten Zellen. In Primärkulturen kolorektaler Karzinome und normaler Kolonschleimhautepithelzellen induzierte Butyrat die LL-37 Expression nur in undifferenzierten Tumorzellen.

Als nächstes wurden Signalwege gesucht, die an der Regulation von LL-37 und der Differenzierung eine Rolle spielen. In Kolonepithelzellen verhindert eine MEK-ERK Blockade eine LL-37 Induktion – ohne die Differenzierung zu beeinträchtigen. Bei einer Blockade des p38/MAP-Kinase Weges stellte es sich genau andersherum dar: Die Differenzierung wurde gehemmt, aber die LL-37 Expression wurde nicht beeinflusst. Somit wird die LL-37 mRNA Transkription in Kolonepithelzellen über den MEK/ERK Signalweg und die Differenzierung in denselben Zellen über den p38/MAP-Kinase Signalweg reguliert.

In undifferenzierten Monozyten kann wie schon in Kolonepithelzellen eine Induktion der LL-37 Expression nach Inkubation mit SCFAs beobachtet werden. Bei reifen PBMC jedoch inhibiert Butyrat eine LL-37 Transkription. In nicht differenzierten Monozyten blockt ein MEK/ERK-Hemmer die LL-37 Expression wie in Kolonepithelzellen, dagegen hat diese Blockade in reifen PBMC keine Auswirkung auf die LL-37 Konzentration. Deshalb können noch weitere unbekannte Mechanismen an der LL-37 Regulation in Darmepithelzellen und den LL-37 exprimierenden Immunzellen beteiligt sein.

Diese Arbeit bietet neue Einblicke in die Regulation des antimikrobiellen Cathelicidins LL-37 in der menschlichen Darmschleimhaut und kann vielleicht die Basis für eine therapeutische Manipulation der LL-37 Expression liefern. Es muss jedoch noch geklärt werden, ob Butyrat oder andere Ernährungsfaktoren die Schleimhautbarriere dadurch stärken können, indem das Peptid LL-37 und oder andere Effektormoleküle der angeborenen Immunabwehr in vivo hochreguliert werden.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

AcN: Acetonitril

AMP: Antimikrobielle Peptide

AP: Alkalische Phosphatase

BSA: Bovines Serumalbumin (syn: FBS)

But: Butyrat

CAMP: cathelicidin antimicrobial peptid

CBB: cold binding buffer

Cdx2: intestinaler Homeobox Transkriptionsfaktor

DAB: 3,3-Diaminobenzidin-4HCl-2H<sub>2</sub>O reinst

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure

EDTA: ethylenediaminetetraacetate

ERK: extracellular signal-regulated protein kinase

FACS: Fluorescence activated cell sorter

FBS: fetal bovine serum (syn: BSA)

g: Erdbeschleunigung (9,81m/s<sup>2</sup>)

gr: Gramm

hCAP-18: human cathelicidin protein 18

HCl: Salzsäure

IL-1/-6: Interleukin 1/ 6

INF- $\alpha$ /- $\gamma$ : Interferon- $\alpha$ /- $\gamma$

Iso-But: Isobutytrat

LIF: Leukozyten induzierender Faktor

LL-37: humanes antimikrobielles Peptid der Familie der Cathelicidine

LPS: Lipopolysacharide

MAP: mitogen-activated protein

MEM: minimal essential medium

ml: Milliliter

mM: millimolar

NaCl: Natriumchlorid/ Kochsalz

NaOH: Natronlauge

PBMC: peripher blood monocytes

PBS: phosphat buffered saline

PMA: 5-methyl-phenazinium methylacid

RNA: Ribonukleic acid/ Ribonukleinsäure

RT: Raumtemperatur

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SCFA: short chain fatty acids

SD: Standardabweichung

SDS: Sodium Dodecyl Sulfat

SSC: Saline-Sodium Citrate (Puffer)

TFA: Trifluor-Essigsäure

TNF $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$

TSA: Trichostatin A

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling

U: units (Internationale Einheiten)

U/min: Umdrehungen pro Minute; 10000rpm entsprechen 16060g



## 7. Abbildungsverzeichnis

	<b>Seite</b>
Abbildung 1: Vom Gen zum fertigen Peptid	3
Abbildung 2: Übersicht über die wichtigsten Effekte antimikrobieller Peptide	4
Abbildung 3: Schema der Real Time RT-PCR	20
Abbildung 4: In der Apoptose wechselt Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite und ermöglicht so die Bindung von Annexin V	28
Abbildung 5: Lebende Zellen sind negativ für Annexin V und Propidiumjodid	29
Abbildung 6: Zeitabhängige LL-37/CAMP Induktion durch Butyrat in SW620 Kolonepithelzellen	33
Abbildung 7: Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der LL-37/CAMP Expression in SW620 Kolonzellen – Zeitabhängigkeit	34
Abbildung 8: Quantitative Real-Time RT-PCR Analysen der LL-37/CAMP Expression in SW620 Kolonzellen – Dosisabhängigkeit	34
Abbildung 9: Induktion der LL-37 Transkription in HT-29 Kolonzellen, die mit 2mM Butyrat inkubiert wurden	35
Abbildung 10: Real-Time PCR Daten der durch unterschiedliche Butyratkonzentrationen von 0,5mM bis 4mM induzierten LL-37 Transkription in HT-29 Kolonzellen nach 24 Stunden	36
Abbildung 11: Induktion der LL-37 Transkription in Geki2 Kolonzellen	36
Abbildung 12: Der Effekt von Butyrat auf die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität in SW620 Kolonepithelzellen	37
Abbildung 13: Der Effekt von Butyrat auf die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität in HT-29 Kolonepithelzellen	38
Abbildung 14: Die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität unter Butyratinkubation in Geki2 Kolonepithelzellen	38
Abbildung 15: Vergleich der Induktion der Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in SW620 Kolonepithelzellen durch luminalen Faktoren	40
Abbildung 16: Effekte einer Auswahl luminaler Faktoren auf die AP-Aktivität	41
Abbildung 17: Bestimmung der apoptotischen SW620 Zellen in der FACS-Analyse	42
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Anzahl apoptotischer SW620 Zellen in der FACS-Analyse	43

Abbildung 19:	Graphische Darstellung der Anzahl apoptotischer Zellen der Zelllinie HT-29 aus der FACS-Analyse – butyratbehandelt	44
Abbildung 20:	Graphische Darstellung der Anzahl apoptotischer Zellen der Zelllinie HT-29 aus der FACS-Analyse – flavonbehandelt	44
Abbildung 21:	Einfluss unterschiedlicher Zytokine auf die LL-37 Expression in HT-29 Kolonepithelzellen – RT-PCR	45
Abbildung 22:	Einfluss unterschiedlicher Zytokine auf die LL-37 Expression in HT-29 Kolonzellen – Real-Time RT-PCR	46
Abbildung 23:	LL-37 Expression in SW620 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit entzündungsfördernden Mediatoren	46
Abbildung 24:	Koinkubation von Butyrat 4mM und TNF $\alpha$ (30 und 60 Minuten) auf SW620 Zellen	47
Abbildung 25:	Induktion der LL-37 Transkription in Primärkulturen aus Zellen kolorektaler Tumoren	48
Abbildung 26:	Die Expression des Peptids LL-37 in Epithelzellen aus dem menschlichen Kolon	49
Abbildung 27:	Die Expression des LL-37-Peptids in Epithelzellen des menschlichen Ileums	49
Abbildung 28:	Der Effekt des spezifischen MEK-ERK Inhibitors UO126 auf die durch Butyrat oder Trichostatin A induzierte Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37	50
Abbildung 29:	Der Effekt des spezifischen MEK-ERK-Inhibitors UO126 und des p38/MAP Kinase Inhibitors SB203580 auf die durch Butyrat induzierte Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in SW620 Zellen	51
Abbildung 30:	Effekte von Butyrat (2mM) allein oder mit spezifischen MEK-ERK Inhibitor UO126 und 400ng/ml Trichostatin A auf die alkalische Phosphatase (AP) Aktivität in HT-29 Kolonepithelzellen	52
Abbildung 31:	Effekt spezifischer Kinase-Inhibitoren auf die durch Butyrat induzierte Zelldifferenzierung in SW620 Zellen	53
Abbildung 32:	Der Effekt spezifischer Kinase-Inhibitoren auf die durch Butyrat induzierte Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in der monozytären Zelllinie U937	54
Abbildung 33:	Unterschiedliche Butyratkonzentrationen haben nach 24 Stunden einen inhibierenden Effekt auf die Expression des antimikrobiellen Peptids LL-37 in PBMC	54

Abbildung 34:	Einfluss der differenzierungsfördernden Substanzen Butyrat oder Trichostatin A und gleichzeitiger MEK-ERK Blockade durch UO126 auf die Expression des antimikrobiellen Peptids LL37 bei PBMC	55
Tabelle 1:	Zusammenfassung der Wirkung kurzkettiger Fettsäuren auf die LL-37 Expression nach 24 Stunden und 48 Stunden in SW620 Kolonepithelzellen	59

## 8. Literaturverzeichnis

1. Garcia JR, Krause A, Schulz S, et al., *Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity*. *Faseb J* 2001; **15**(10):1819-21
2. Harder J, Bartels J, Christophers E, et al., *A peptide antibiotic from human skin*. *Nature* 1997; **387**(6636):861
3. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, et al., *The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes*. *Eur J Biochem* 1996; **238**(2):325-32
4. Fearon DT, Locksley RM, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*, *Science* 1996; **272**(5258):50-3
5. Medzhitov R, Janeway CA Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*, *Cell*. 1997; **91**(3):295-8
6. Boman HG, *Innate immunity and the normal microflora*. *Immunol Rev.* 2000; 173:5-16
7. Zasloff M, *Antimicrobial peptides in health and disease*. *N Engl J Med.* 2002; **347**(15):1199-200
8. Bals R, *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*. *Respir Res.* 2000;**1**(3):141-50
9. Hancock RE, *Peptide antibiotics*, *Lancet* 1997; **349**:412-22
10. Hristova K, Selsted ME, White SH, *Critical role of lipid composition in Membran permeabilization by rabbit neutrophil defensins*. *J Biol Chem* 1997; **272**:24224-33
11. Lohner K, Latal A, Lehrer RJ, et al., *Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems*. *Biochemistry* 1997; **36**:1525-31
12. Agerberth B, Lee J, Bergmann T, et al., *Amino acid sequence of PR-39: Isolation from Pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides*, *Eur J Biochem* 1991; **202**:849-54
13. Shi J, Ross C, Chengappa M, et al., *Identification of a proline-arginine-rich antibacterial peptide from neutrophils that is analougenous to PR-39, an antimicrobial peptide from the small intestine*. *J Lekoc Biol* 1994; **56**:807-11
14. Shafer WM, Qu X, Waring AJ, et al., *Modulation of Neisseria gonorrhoeae susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; **95**(4):1829-33
15. Lysenko ES, Gould J, Bals R, et al., *Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract*. *Infect Immun.* 2000; **68**(3):1664-71
16. Ganz T, Lehrer RI, *Defensins*. *Curr Opin Immunol.* 1994; **6**(4):584-9

17. Ganz T, *Defensins and host defense*. Science 1999; **286**(5439):420-1
18. Yang D, Chertov O, et al., *Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37)*. J Leukoc Biol 2001; **69**:691-697
19. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, et al., *FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis*. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; **92**(1):195-9
20. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N, *hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules*. FEBS Lett 1995; **368**(1):173-6
21. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, et al., *Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein*. Infect Immun 1995; **63**(4):1291-7
22. Agerberth B, Charo J, Werr J, et al., *The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations*. Blood 2000; **96**(9):3086-93
23. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, et al., *The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders*. J Biol Chem 1997; **272**(24):15258-63
24. Bals R, Wang X, Zasloff M, et al., *The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; **95**(16):9541-6
25. Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sorensen O, et al., *The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6*. Infect Immun 1999; **67**(5):2561-6
26. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, et al., *Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator*. Nat Med 2001; **7**(2):180-5
27. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, et al., *Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37*. J Biol Chem 1998; **273**(6):3718-24
28. Zaiou M, Nizet V, Gallo RL, *Antimicrobial and Protease Inhibitory Functions of the Human Cathelicidin (hCAP18/LL-37) Prosequence*. J Invest Dermatol. 2003; **120**(5):810-816
29. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, et al., *The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 is Involved in Re-Epithelialization of Human Skin Wounds and is Lacking in Chronic Ulcer Epithelium*. J Invest Dermatol. 2003; **120**(3):379-89
30. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, et al., *An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18*. J Clin Invest. 2003; **111**(11):1665-72
31. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, et al., *Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection*. Nature 2001; **414**(6862):454-731

32. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, et al., *Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis*. Cell 1997; **88**(4):553-60
33. Bals R, Weiner DJ, *Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model*. J Clin Invest. 1999; **103**(8):1113-7
34. Putsep K, Carlsson G, et al., *Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study*. Lancet. 2002; **360**(9340):1144-9
35. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al., *Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis*. N Engl J Med. 2002; **347**(15):1151-60
36. Gudmundsson GH, Agerberth B, *Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system*. J Immunol Methods 1999; **232**(1-2):45-54
37. Bevins CL, Martin-Porter E, Ganz T, *Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract*. Gut 1999; **45**(6):911-5
38. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, et al., *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium*. J Immunol 1999; **163**(12):6718-24
39. Cunliffe R, Rose F, et al., *Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease*. Gut 2001; **48**: 176-185
40. Ayabe T, Satchell DP, et al., *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. Nat Immunol. 2000; **1**(2):113-8
41. O'Neil DA, Cole SP, Martin-Porter E, et al., *Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with Helicobacter pylori or stimulation with interleukin-1*. Infect Immun 2000; **68**(9):5412-5
42. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. Science 1999; **286**(5437):113-7
43. Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, et al., *The multifaceted Paneth cell*. Cell Mol Life Sci 2002; **59**(1):156-70
44. Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, et al., *Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector*. Science 1999; **285**(5435):1920-3
45. Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, et al., *Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade*. Nat Cell Biol 2001; **3**(3):301-5
46. Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, et al., *Epithelial antibiotic induced in states of disease*. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; **94**(16):8686-90
47. Spaeth G, Berg RD, Specian RD, et al., *Food without fiber promotes bacterial translocation from the gut*. Surgery 1990; **108**(2):240-6; discussion 24
48. Cummings JH, *Short chain fatty acids in the human colon*. Gut 1981; **22**(9):763-79

49. Roediger WE, *Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon.* Gastroenterology 1982 Aug; **83**(2):424-9
50. Scheppach W, *Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function.* Gut 1994; **35**(1 Suppl):S35-8
51. Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, et al., *Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis.* Gastroenterology 1992; **103**(1):51-6
52. Roediger WE, *Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man.* Gut, 1980. **21**(9): p. 793-8
53. Roediger WE, Nance S, *Selective reduction of fatty acid oxidation in colonocytes: correlation with ulcerative colitis.* Lipids, 1990. **25**(10): p. 646-52
54. Solomon MJ, Schnitzler M, *Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment.* World J Surg, 1998. **22**(4): p. 352-8
55. Hass R, et al., *Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig [comment].* Gastroenterology, 1997. **112**(3): p. 875-81
56. Scheppach W, et al., *Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1992. **16**(1): p. 43-8
57. Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL, *Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia.* Dig Dis Sci, 1996. **41**(4): p. 727-39
58. Velazquez OC, et al., *In vivo crypt surface hyperproliferation is decreased by butyrate and increased by deoxycholate in normal rat colon: associated in vivo effects on c-Fos and c-Jun expression.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1996. **20**(4): p. 243-50
59. Hague A, Paraskeva C, *The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines.* Eur J Cancer Prev, 1995. **4**(5): p. 359-64
60. Gamet L, et al., *Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29.* Int J Cancer, 1992. **52**(2): p. 286-9
61. Basson MD, et al., *Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate.* Dig Dis Sci, 1996. **41**(10): p. 1989-93
62. Basson MD, Emenaker NJ, Hong F, *Differential modulation of human (Caco-2) colon cancer cell line phenotype by short chain fatty acids.* Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **217**(4): p. 476-83
63. Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH *Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines.* Cancer Res 1994; **54**(12):3288-93
64. Fan YY, et al., *Antagonism of CD95 signaling blocks butyrate induction of apoptosis in young adult mouse colonic cells.* Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 1): p. C310-9
65. Barnard JA, Warwick G, *Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells.* Cell Growth Differ. 1993; **4**(6):495-501

66. Janson W, Brandner G, Siegel J, *Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53- independent differentiation and apoptosis*. *Oncogene*, 1997. **15**(12): p. 1395-406
67. Litvak DA, et al., *Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1*. *Surgery*, 1998. **124**(2): p. 161-9; discussion 169-70
68. Lupton JR, *Butyrate and colonic cytokinetics: differences between in vitro and in vivo studies*. *Eur J Cancer Prev*, 1995. **4**(5): p. 373-8
69. McIntyre A, Gibson PR, Young GP, *Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model*. *Gut*, 1993. **34**(3): p. 386-91
70. McIntyre A, et al., *Different fibers have different regional effects on luminal contents of rat colon*. *Gastroenterology*, 1991. **101**(5): p. 1274-81
71. Weaver GA, et al., *Short chain fatty acid distributions of enema samples from a sigmoidoscopy population: an association of high acetate and low butyrate ratios with adenomatous polyps and colon cancer*. *Gut*, 1988. **29**(11): p. 1539-43
72. Gibson PR, et al., *Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate*. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(4): p. 539-44
73. Csordas A., *Butyrate, aspirin and colorectal cancer [see comments]*. *Eur J Cancer Prev*, 1996. **5**(4): p. 221-31
74. Archer SY, Hodin RA, *Histone acetylation and cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 1999. **9**(2): p. 171-4
75. Bernhard D, et al., *Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts*. *Faseb J*, 1999. **13**(14): p. 1991-2001
76. Saito A, et al., *A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(8): p. 4592-7
77. Witt O, Sand K, Pekrun A, *Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways*. *Blood* 2000; **95**(7):2391-6
78. Fehlbauer P, Rao M, et al., *An essential amino acid induces epithelial beta -defensin expression*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; **97**(23):12723-8
79. Wu H, Zhang G, Minton JE, et al., *Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and Salmonella enterica serovar typhimurium infection*. *Infect Immun*. 2000; **68**(10):5552-8
80. Gibson UE, Heid CA, Williams PM, *A novel method for real time quantitative RT-PCR*. *Genome Res*. 1996; **6**(10):995-1001
81. Hylla S, Gostner A, Dusel G, et al., *Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention*. *Am J Clin Nutr* 1998; **67**(1):136-42.



82. Aubry JP, et al., *Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity*. Cytometry, 1999. **37**(3): p. 197-204
83. Clarke RG, et al., *Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-G0 DNA content*. Cytometry, 2000. **39**(2): p. 141-50
84. Hase K, Eckmann L, Leopard JD, et al., *Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium*. Infect Immun 2002; **70**(2):953-63
85. Ding Q, Wang Q, Evers BM, *Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation*. Biochem Biophys Res Commun 2001; **284**(2):282-8
86. Witt O, Schulze S, Kanbach K, et al., *Tumor cell differentiation by butyrate and environmental stress*. Cancer Lett 2001; **171**(2):173-82
87. Davido DJ, Richter F, Boxberger F, et al., *Butyrate and propionate downregulate ERK phosphorylation in HT-29 colon carcinoma cells prior to differentiation*. Eur J Cancer Prev 2001; **10**(4):313-21
88. Agerberth B, Grunewald J, Castanos-Velez E, et al., *Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients*. Am J Respir Crit Care Med 1999; **160**(1):283-90
89. Frohm M, Gunne H, Bergman AC, et al., *Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid*. Eur J Biochem 1996; **237**(1):86-92
90. Gustafsson BE, *The physiological importance of the colonic microflora*. Scand J Gastroenterol Suppl 1982; **77**:117-31
91. Dwinell MB, Lugerling N et al., *Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology. 2001; **120**(1):49-59
92. Boman HG, *Antibacterial peptides: key components needed in immunity*. Cell 1991; **65**(2):205-7
93. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, et al., *Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells*. Cancer Res 2000; **60**(14):3823-31
94. Hague A, Singh B, Paraskeva C, *Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate*. Gastroenterology. 1997; **112**(3):1036-40
95. Hague A, Diaz GD, et al., *bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis*. Int J Cancer. 1997; **72**(5):898-905
96. Barkla DH, Gibson PR, *The fate of epithelial cells in the human large intestine*. Pathology 1999; **31**(3):230-8

97. Hague A, Elder DJ, et al., *Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate*. Int J Cancer. 1995; **60**(3):400-6
98. McKnight GS, Hager L, Palmiter RD, *Butyrate and related inhibitors of histone deacetylation block the induction of egg white genes by steroid hormones*. Cell 1980; **22**(2 Pt 2):469-77
99. Yang J, Kawai Y, et al., *Sodium butyrate induces transcription from the G alpha(i2) gene promoter through multiple Sp1 sites in the promoter and by activating the MEK-ERK signal transduction pathway*. J Biol Chem. 2001; **276**(28):25742-52
100. Domon-Dell C, Wang Q, et al., *Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells*. Gut. 2002; **50**(4):525-9
101. Suh E, Traber PG, *An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation*. Mol Cell Biol. 1996; **16**(2):619-25
102. Silberg DG, Swain GP, et al., *Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development*. Gastroenterology. 2000; **119**(4):961-71
103. Venkatraman A, Ramakrishna BS, Pulimood AB, *Butyrate hastens restoration of barrier function after thermal and detergent injury to rat distal colon in vitro*. Scand J Gastroenterol 1999; **34**(11):1087-92
104. Rabbani GH, Albert MJ, Hamidur Rahman AS, et al., *Short-chain fatty acids improve clinical, pathologic, and microbiologic features of experimental shigellosis*. J Infect Dis 1999; **179**(2):390-7
105. Luhrs H, Gerke T, Boxberger F, et al., *Butyrate inhibits interleukin-1-mediated nuclear factor-kappa B activation in human epithelial cells*. Dig Dis Sci 2001; **46**(9):1968-73
106. Luhrs H, Gerke T, Schaubert J, et al., *Cytokine-activated degradation of inhibitory kappaB protein alpha is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate*. Int J Colorectal Dis 2001; **16**(4):195-201
107. Luhrs H, Kudlich T, et al., *Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB*. Anticancer Res. 2002; **22**(3):1561-8
108. Saemann MD, Parolini O, Bohmig GA, et al., *Bacterial metabolite interference with maturation of human monocyte-derived dendritic cells*. J Leukoc Biol 2002; **71**(2):238-46
109. De Y, Chen Q, Schmidt AP, et al., *LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells*. J Exp Med 2000; **192**(7):1069-74
110. Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE, *Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines*. Leukemia 2002; **16**(4):683-92

111. Rius C, Zorrilla A, Mata F, et al., *Comparative effects of butyrate and N6, 2'-O-dibutyryl adenosine-3':5'-cyclic monophosphate on growth, differentiation and gene expression in U937 human monoblastoid cells*. *Biochem Int* 1991; **23**(3):555-62
112. Timmermann S, Lehrmann H, Polesskaya A, et al., *Histone acetylation and disease*. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**(5-6):728-36
113. Bohmig GA, Krieger PM, Saemann MD, et al., *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):234-43

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach für die Möglichkeit danken, dieses Thema zu bearbeiten und die Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Für die geduldige Betreuung und Anregungen im praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit danke ich meinem Betreuer Dr. med. Jürgen Schauber.

Dem Team des Gastrolabors – Gerda Dusel, Elisabeth Kelber, Kerstin Backhaus, Donata Dorbert und Frank Weiler- gilt mein besonderer Dank für technische und moralische Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei dem Böhlinger Ingelheim Fonds, der es mir ermöglicht hat, für zwei Monate nach Schweden an das Karolinska Institutet zu fahren und dort die Real-Time PCR zu erlernen und durchzuführen. Dabei geht ein besonderer Dank an Dr. Kerstin Falk (Schwedisches Institut für Infektionskontrolle, Karolinska Institutet) für ihre unschätzbare Hilfe für die Etablierung des Real-Time RT-PCR Assays und Dr. Matthias Eck und Dr. Bernd Schmausser (Pathologisches Institut, Universität Würzburg) für ihre Hilfe bei der Immunohistochemiefärbung.

Ein ganz besonderer Dank geht hiermit an meine Freundin Bettina für Ihre Unterstützung und Geduld während dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde erst möglich durch die finanzielle Unterstützung des Schwedischen medizinischen Forschungsbüros, der Schwedischen Gesellschaft für Strategische Forschung, der Petrus and Augusta Hedlund's Foundation, der Ruth and Richard Julin's Foundation, der Prof. Nanna Svartz' Foundation und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.



## **Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name	Konrad Ferdinand Iffland
Geburtsdatum	10.11.1975
Geburtsort	Stuttgart
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

### **Schulbildung**

IX/1982 - VII/1986:	Besuch der Grundschule Illerkirchberg
IX/1986 - VII/1995:	Besuch des Humboldt-Gymnasiums Ulm Abschluss mit Abitur, Note 2.0

### **Bundeswehr**

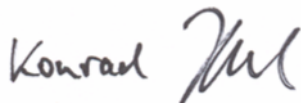
X/1995 - IX/1996	Ableistung des Wehrdienstes in der Luftlandesaniitätskompanie 250 in Ulm
------------------	---

### **Hochschulausbildung**

WS 1996/97	Studium der Medizin an der Universität Ulm
SS 1997- WS 1998/99	Studium der Medizin an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
SS 1999- SS 2003	Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
X/2002 – IX/2003:	Praktisches Jahr an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg in den Fächern Innere Medizin, Radiologie und Chirurgie
Physikum:	März 1999
1. Staatsexamen:	August 2000
2. Staatsexamen:	August 2002
3. Staatsexamen:	18. November 2003

Seit IV/2004 AIP in der Medizinischen Klinik 6 des Klinikums Nürnberg.

Nürnberg, Mai 2004



Konrad Iffland

