

Antimikrobielle Aktivität der Histone bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Fakultät Naturwissenschaften

Universität Hohenheim

Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie

Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft

Fachgebiet Biochemie der Ernährung

Universität Hohenheim

vorgelegt von

Yasmin Kunkel

aus Sinsheim

2017

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer

1. berichtende Person: Prof. Dr. Eduard F. Stange

2. berichtende Person: Prof. Dr. Lutz Graeve

Eingereicht am: 14.02.2017

Mündliche Prüfung am: 18.01.2018

Die vorliegende Arbeit wurde am 26.04.2017 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Diese Arbeit wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart, in der Arbeitsgruppe von Professor Eduard F. Stange durchgeführt und von der Robert Bosch Stiftung unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
III.	Tabellenverzeichnis.....	VII
IV.	Zusammenfassung.....	IX
V.	Abstract.....	XI
1	Einleitung.....	1
1.1	Der menschliche Darm.....	1
1.1.1	Komponenten der intestinalen Mukosabarriere.....	1
1.1.2	Abwehrmechanismen der intestinalen Mukosa.....	3
1.2	Antimikrobielle Peptide (AMPs).....	4
1.2.1	Defensine.....	6
1.2.1.1	α -Defensine.....	7
1.2.1.2	β -Defensine.....	8
1.2.2	Cathelicidin.....	9
1.2.3	Antimikrobiell wirksame Peptide im Kolon.....	11
1.3	Histone.....	12
1.3.1	Das Nukleosom.....	13
1.3.2	Extranukleäre Histonaktivität.....	14
1.4	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	16
1.4.1	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	17
1.4.2	Genetische Disposition.....	19
1.4.3	Mikrobielle Faktoren.....	20
1.4.4	Defekte der intestinalen Mukosabarriere.....	22
1.5	Zielsetzung.....	26
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	28

2.1.2	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3	Geräte	30
2.1.4	Kits.....	31
2.1.5	Rekombinante Peptide.....	32
2.1.6	Antikörper	32
2.1.7	Mikroorganismen.....	33
2.1.8	Oligonukleotide.....	34
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Biologisches Material	34
2.2.2	Aufarbeitung der Proben	34
2.2.2.1	Aufarbeitung mit Essigsäure für antimikrobielle Aktivität.....	34
2.2.2.2	Aufarbeitung mit TRIzol Reagent	35
2.2.2.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	37
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.3.1	PCR.....	38
2.2.3.2	Agarosegelelektrophorese	38
2.2.3.3	Quantifizierung der RNA und Beurteilung der Qualität.....	39
2.2.3.4	cDNA-Synthese	40
2.2.3.5	Klonieren der cDNA in <i>E. coli</i>	41
2.2.3.6	Realtime-PCR (Q-PCR).....	42
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	43
2.2.4.1	Western Blot.....	43
2.2.4.1.1	Coomassie-Färbung.....	45
2.2.4.1.2	Ponceau-Färbung.....	46
2.2.4.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
2.2.4.3	Immunhistologische Färbung	47
2.2.4.3.1	Aufarbeitung der Proben.....	47
2.2.4.3.2	Vorbehandlung der Gewebeschnitte	48
2.2.4.3.3	Immunologische Färbung von Gewebeschnitten.....	48

2.2.4.4	Extraktion von Histonen.....	50
2.2.4.5	Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).....	51
2.2.4.6	Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS).....	53
2.2.5	Mikrobiologische Methoden.....	54
2.2.5.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Candida albicans</i>	54
2.2.5.2	Anzucht anaerober Bakterienstämme.....	54
2.2.5.3	Anzucht der <i>Clostridium difficile</i> -Stämme	55
2.2.5.4	Durchflusszytometrie.....	55
2.2.5.4.1	Durchflusszytometrischer Vitalitätstest.....	55
2.2.5.5	Radial Diffusion Assay (RDA).....	57
2.2.5.6	Clostridien-Toxintest.....	58
2.2.5.7	Elektronenmikroskopie.....	59
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Teil 1 - Systematische Analyse der Kernhistone im Kolon.....	60
3.1.1	Das Kollektiv.....	60
3.1.2	Quantifizierung der Genexpression der Kernhistone in Kolonbiopsien	61
3.1.3	Quantifizierung der Proteinexpression der Kernhistone in Kolonbiopsien.....	63
3.1.4	Korrelation der mRNA- Proteinexpression.....	65
3.1.5	Antimikrobielle Aktivität der Gesamtproteine aus Kolonbiopsien.....	67
3.2	Teil 2 - Extraktion und Analyse der Histone im Kolon.....	69
3.2.1	Extraktion und Analyse von Histonen aus Resektaten	70
3.2.1.1	Fraktionierung der Histonextrakte durch RP-HPLC.....	71
3.2.1.2	Massenspektrometrie der HPLC-Fraktionen.....	72
3.2.1.3	Antimikrobielle Aktivität der HPLC-Fraktionen von Histonextrakten	77

3.2.2	Immunhistologische Betrachtung von Histonen in der Kolonmukosa...	78
3.2.3	Extraktion und Analyse von Histonen aus Kolonbiopsien.....	79
3.2.4	Extraktion und Analyse von Histonen aus Mukusbürsten.....	83
3.3	Teil 3 – Antimikrobielle Aktivität rekombinanter Histone	85
3.3.1	Synergismusstudie	85
3.3.2	Histone versus Clostridien.....	90
3.3.3	RDA	93
3.3.4	Elektronenmikroskopie	94
4	<i>Diskussion</i>	97
4.1	Teil 1 – Systematische Analyse der Kernhistone	97
4.2	Teil 2 – Extraktion und Analyse der Histone im Kolon.....	100
4.3	Teil 3 – Antimikrobielle Aktivität rekombinanter Histone	105
4.4	Fazit und Ausblick	108
5	<i>Literaturverzeichnis</i>	111
6	<i>Publikationsliste</i>	142
7	<i>Danksagung</i>	143

I. Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielles Peptid
<i>B. adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>B. longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>B. vulgatus</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> -assoziierte Diarrhoe
cDNA	Komplementäre DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CU	Colitis ulcerosa
d	Durchmesser
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAHC	Diammoniumhydrogencitrat
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern molecule</i>
DiBAC ₄ (3)	Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FSC (<i>forward scatter</i>)	Vorwärtsstreulicht
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
HBD	Humanes Beta Defensin
HD	Humanes Defensin
HNP	Humanes neutrophiles Peptid
HPLC (<i>high performance liquid chromatography</i>)	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ig	Immunglobulin

infl (<i>inflamed</i>)	entzündet
k	Kilo
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF-MS	Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations time-of-flight Massenspektrometrie
MC	Morbus Crohn
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
M-Zelle	Mikrofaltenzelle
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NOD	<i>Nucleotide binding oligomerisation domain</i>
non (<i>non inflamed</i>)	nicht entzündet
p.a. (<i>pro analysi</i>)	analyserein
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PRR (<i>pattern recognition receptor</i>)	Mustererkennungsrezeptor
PI	Patientenisolat
PIC	Proteinase-Inhibitorcocktail (PMSF, Pepstatin und Leupeptin)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	Polymerase-Kettenreaktion
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
Q-PCR	Realtime-PCR
ROS	Reactive oxygen species
rpm (<i>revolutions per minute</i>)	Umdrehungen pro Minute
RP-HPLC	<i>Reversed-phase high performance liquid chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SNP (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)	Einzelnukleotid-Polymorphismus

SSC (<i>side scatter</i>)	Seitwärtsstreulicht
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenon Monohydrat
TLR	Toll-like Rezeptor
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
V	Volt

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Überblick über die wesentlichen Strukturklassen der AMPs.....	5
Abbildung 2 Schematische Darstellung der α -, β - und θ -Defensine.	6
Abbildung 3 Überblick und Hauptmerkmale der Nukleosomstruktur.....	13
Abbildung 4 Neutrophile und NETs.....	15
Abbildung 5 FACS Dotplot der <i>E. coli</i> K12 Population und Overlay Histogramm der FL-1-Fluoreszenz.	57
Abbildung 6 Überblick der mit Kolonbiopsien durchgeführten Gen-, Protein-expression und Aktivitätsanalysen.....	60
Abbildung 7 mRNA-Expression der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4.....	62
Abbildung 8 Exemplarische Darstellung eines Western Blots von 10 Patienten der Kontrollgruppe gegen Histon H2A.	64
Abbildung 9 Proteinexpressionsergebnisse der Kernhistone.....	65
Abbildung 10 Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinexpression der vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 in Kolonbiopsien.....	66
Abbildung 11 Antimikrobielle Aktivität der kationischen Biopsieextrakte von Patienten mit MC, CU und Kontrollen gegen <i>E. coli</i> K12 und <i>B. adolescentis</i>	68
Abbildung 12 Forward Scatter-Sideward Scatter Dotplot von unbehandelten und mit HBD3 sowie den kationischen Biopsieextrakten behandelten <i>E. coli</i> K12-Zellen.....	69
Abbildung 13 Überblick der durchgeführten Histonextraktionsversuche mit Resektaten und Kolonbiopsien.....	70
Abbildung 14 Chromatogramme der RP-HPLC-Läufe der drei Histonextrakte RM25, RM44 und RM65 aus Resektaten.....	71
Abbildung 15 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten molekularen Massen der rekombinanten Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 ..	73
Abbildung 16 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten molekularen Massen der Kernhistone im Histonextrakt RM25 der HPLC-Fraktionen 2, 6, 7, 9 und 10	74

Abbildung 17 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten molekularen Massen der Kernhistone im Histonextrakt RM44 der HPLC-Fraktionen 2, 6 und 8	75
Abbildung 18 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten molekularen Massen der Kernhistone im Histonextrakt RM65 der HPLC-Fraktionen 2, 6a, 6b, 8, 9b und 10	75
Abbildung 19 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten molekularen Massen unbekannter Peptide/Proteine in Histonextrakt RM25 Fraktion 3, Histonextrakt RM65 Fraktion 1 und Fraktion 5.....	76
Abbildung 20 Antimikrobielle Aktivität der RP-HPLC-Fraktionen der Histonextrakte RM25, RM44 und RM65 gegen <i>E. coli</i> K12	77
Abbildung 21 Immunhistologische Identifizierung der Kernhistone H2B, H3 und H4 in Mukus und Mukosa des Kolons.....	79
Abbildung 22 Aktivität der Histonextrakte aus Kolonbiopsien gegen <i>E. coli</i> ATCC 25922 und <i>S. aureus</i> ATCC 25923	80
Abbildung 23 Aktivität der Histonextrakte aus Kolonbiopsien gegen <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>C. albicans</i> 562, <i>B. vulgatus</i> ATCC 8482 und das Patientenisolat <i>S. aureus</i> PI375.....	82
Abbildung 24 Konzentration der Kernhistone H2A und H2B aus Mukusabstrichen.....	83
Abbildung 25 Antimikrobielle Aktivität der Histonextrakte aus Mukusbürsten gegen <i>E. coli</i> ATCC 25922 und <i>S. aureus</i> ATCC 25923	84
Abbildung 26 Overlay Histogramm der FL1-Fluoreszenz des unbehandelten <i>E. coli</i> Patientenisolats 395 und der mit H2A, H4 und H2A + H4 behandelten Zellen..	86
Abbildung 27 Antimikrobielle Aktivität rekombinanter Histone alleine, in Kombination untereinander sowie in Kombination mit HBD1, HBD3 und LL37 gegen <i>E. coli</i> Patientenisolat 395, <i>E. coli</i> Patientenisolat 868, <i>S. aureus</i> Patientenisolat 875, <i>S. aureus</i> Patientenisolat 375, <i>C. albicans</i> PI526, <i>C. albicans</i> Patientenisolat 248, <i>B. fragilis</i> PZ4046 und <i>B. fragilis</i> Patientenisolat 288.....	88

Abbildung 28 Antimikrobielle Aktivität der rekombinanten Histone alleine, in Kombination untereinander und in Kombination mit HBD1, HBD3 und LL37 gegen die Clostridienstämme <i>C. difficile</i> 003, 7208, 5701 und 3331	92
Abbildung 29 Toxin A/B-Produktion verschiedener <i>C. difficile</i> Patientenisolate durch Histone bzw. Histonkombinationen.....	93
Abbildung 30 RDA gegen <i>S. aureus</i> ATCC 25923 auf Schaedler-Bouillon-Platten....	94
Abbildung 31 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Histon- bzw. Defensinwirkung gegen <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	95
Abbildung 32 Mikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahmen der Histonwirkung gegen vegetative Zellen von <i>C. difficile</i> 003	96

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Merkmale der fünf Histonklassen.....	12
Tabelle 2: Auflistung aller verwendeter Chemikalien und Reagenzien.	28
Tabelle 3: Liste aller Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 4: Liste aller verwendeter Geräte.....	30
Tabelle 5: Liste aller verwendeter Kits	31
Tabelle 6: Liste aller verwendeter rekombinanter Peptide	32
Tabelle 7: Liste aller verwendeter Antikörper	32
Tabelle 8: Liste aller Mikroorganismen.....	33
Tabelle 9: Liste aller in dieser Studie verwendeter Oligonukleotide.....	34
Tabelle 11: Anleitung 0,1 M Phosphatpuffer.....	35
Tabelle 12: Pipettierschema der BSA-Standardreihe nach Bradford	37
Tabelle 13: Reaktionsansatz und Programmbeispiel einer Standard-PCR.....	38
Tabelle 14: Anleitung 50 x TAE-Puffer	39
Tabelle 15: Anleitung Mastermix (1 x) cDNA-Synthese bei 500 ng RNA.....	40
Tabelle 16: Anleitung Mastermix (1 x) der Q-PCR.....	43
Tabelle 17: Typisches Lightcycler-Programm	43
Tabelle 18: Anleitung Semi-Dry Transferpuffer und TBST-Waschpuffer.....	45
Tabelle 19: Antikörperverdünnungen für Western Blots.....	45
Tabelle 20: Anleitung der drei Lösungen der Coomassie-Färbung	46
Tabelle 21: Zusammensetzung der Carnoy'schen Fixierlösung.....	47
Tabelle 22: Liste aller für die Immunhistochemie verwendeter Primärantikörper und ihre jeweiligen Verdünnungen.....	50
Tabelle 23: Anleitung für die Herstellung des Waschpuffers.....	50
Tabelle 24: Zusammensetzung des verwendeten Lösungsmittelgradienten der HPLC-Analysen.....	52
Tabelle 25: Anleitung DiBAC ₄ (3)-Stammlösung.....	56
Tabelle 26: Übersicht über die im Kollektiv enthaltenen Kolonbiopsien und Einteilung in die jeweilige Gruppe.....	61

Tabelle 27: Zeiten der Fraktionierung bei der RP-HPLC der drei Histonextrakte RM25, RM44 und RM65. Aufgezeigt sind die Start- und Stoppzeiten in min der einzelnen HPLC-Fractionen.	72
Tabelle 28: Vergleich der durch MALDI-TOF-MS detektierten und theoretischen molekularen Massen der Kernhistone.	74
Tabelle 29: Zusammenstellung der durch MALDI-TOF-MS detektierten molekularen Massen unbekannter Peptide/Proteine.....	76

IV. Zusammenfassung

Der menschliche Darm beherbergt eine Vielzahl von Mikroorganismen. Neben seiner Funktion als Schutzschicht gegen Pathogene, muss er gleichzeitig eine exzessive Immunantwort gegen Kommensale verhindern. Eine entscheidende Rolle in der Verteidigung spielen antimikrobielle Peptide (AMPs), die aufgrund ihres kationischen Charakters spannungsabhängige Kanäle auf der Oberfläche von Mikroorganismen ausbilden und diese zerstören. Neben den „klassischen AMPs“ konnten weitere antimikrobiell aktive Polypeptide, wie z.B. Mitglieder der Histonfamilie isoliert werden. Histone sind basische Proteine, die als Bestandteil des Chromatins für die Verpackung der DNA verantwortlich und Ort posttranslationeller Modifikationen sind. Man unterscheidet fünf Familien, die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 sowie das Linkerhiston H1. Extrazellulär zeigen Histone eine starke antimikrobielle Wirkung gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen, wobei der Mechanismus der Histontoxizität bisher wenig aufgeklärt ist. Wird die antimikrobielle Schutzschicht des Darms geschwächt, z.B. durch eine verminderte Expression antimikrobiell wirksamer Peptide, können Mikroorganismen in die Mukosa eindringen und zu Entzündungsreaktionen führen. Dieser Prozess konnte bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), wie Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Rolle der Histone bei der Symptomausprägung der CED zu untersuchen.

Im ersten Teil wurde eine systematische Analyse des Transkriptom (Q-PCR) und Translatoms (Western Blots) der Kernhistone in Kolongewebe durchgeführt. Bei der Genexpression zeigte sich in entzündeten MC-Gewebe eine tendenzielle Erhöhung der Histone, die bei H2A und H2B sogar signifikant ausfiel. Die Quantifizierung auf Proteinebene ergab eine extreme Streuung der Expressionsstärke bei allen Kernhistonen, unabhängig von der untersuchten Gruppe. Signifikante Unterschiede waren nicht zu erkennen. H2B war im Trend in der Entzündung erniedrigt.

Nach der systematischen Analyse wurde im zweiten Teil der Fokus auf isolierte Histone aus humanem Kolongewebe gelegt. Im Vorfeld wurden verschiedene Methoden zur Isolierung der Histone verglichen. Dazu wurden die extrahierten Histone durch

Fraktionierungen per RP-HPLC und Massenanalyse mit MALDI-TOF-MS überprüft. Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben, dass die antimikrobielle Aktivität der isolierten Histone aus verschiedenen Darmgeweben und Mukus bei verschiedenen Mikroorganismen keine Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und CED-Patienten zeigten. Lediglich bei *S. aureus* ließ sich eine signifikant erhöhte Histonaktivität in entzündetem CU-Gewebe erkennen. Die Wirkung der extrahierten Histone scheint stammspezifisch zu sein und lässt eine höhere Aktivität gegen die getesteten grampositiven Spezies erkennen. Mit Hilfe immunhistologischer Färbungen konnten erwartungsgemäß extrazelluläre Histone im Mukus nachgewiesen werden. Mit Hilfe von ELISAs wurden im Mukus die Proteinkonzentrationen von H2A und H2B bestimmt und eine leichte Erhöhung der Histonproteine in CU-Gewebe beobachtet.

Im letzten Teil der Arbeit wurden mittels durchflusszytometrischer Vitalitätstests die Wechselwirkungen zwischen rekombinanten Histonen, sowohl untereinander als auch mit anderen AMPs, untersucht. Dabei zeigte sich in allen Fällen eine stammspezifische Steigerung der antimikrobiellen Aktivität der Histone. Häufig traten synergistische Effekte auf. Durch elektromikroskopische Aufnahmen konnte die Wirkungsweise der Histone gegen verschiedene Bakterien visualisiert und eine Verklumpung der Bakterien sowie ein massiver Verlust der Zellintegrität beobachtet werden.

Veränderungen des Transkriptoms und des Translatoms der Histone sowie der antimikrobiellen Histonaktivität bei CED-Patienten hätten als pathologische Defekte der Erkrankungen gewertet werden können. Solche Effekte konnten in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Aufgrund ihrer enormen antimikrobiellen Aktivität spielen Histone aber trotzdem eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen im Kolon. Ob Histone ein therapeutisches Potenzial besitzen und inwieweit sie als neue Antibiotika eingesetzt werden können, müssen weiterführende Studien zeigen. Diese Arbeit konnte das starke, mit klassischen AMPs durchaus vergleichbare, Potenzial der Histone gegen die verschiedensten Erreger bestätigen und auf diese Weise Anregungen für nachfolgende Studien bringen.

V. Abstract

The human intestine harbours a multitude of microorganisms. In addition to its function as a protective layer against pathogens, it has to prevent an excessive immune answer against commensales simultaneously. Antimicrobial Peptides (AMPs) with their cationic character are playing an essential role in protection, because they are able to form voltage dependent channels on the surface of microorganism, which kill pathogens. In addition to the classical AMPs more antimicrobial active polypeptides, such as members of the histone family, were isolated. Histones are alkaline proteins, which are components of the chromatine. They are foremost responsible for packaging the DNA and for posttranslational modifications. Five different families can be differentiated: the core histones H2A, H2B, H3 and H4, as well as the linker histone H1. While extracellular histones show strong antimicrobial activity against a broad spectrum of microorganisms, the mechanism of their toxicity has not yet been sufficiently determined. If the antimicrobial protection layer of the intestine is weakened, due to a diminished expression of AMPs for instance, microorganisms can penetrate the mucosa and trigger inflammations. These findings have been confirmed in different tissues of patients with inflammatory bowel diseases (IBD), such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The aim of this work is to determine whether histones play a role in IBD.

In the first part a systematic analysis of the transcriptome (Q-PCR) and the translate (Western Blotting) of the core histones of colonic tissue was performed. In tissues of patients with CD gene expression data showed generally an increase of histones. In the cases of H2A and H2B the increase was significant. The quantification on the protein level offered an extreme variance of the expression of all core histones, irrespective of the analysed group. Significant differences were not detected. However, in trend H2B was lower in inflammation.

After the systematic analysis, histones were then isolated of human colonic tissue. Before the extracted histones were fractionated via RP-HPLC and screened via MALDI-TOF-MS, different methods for the isolation of histones had been compared. The antimicrobial activity of the isolated histones of different intestinal tissues and mucus showed no differences between healthy controls and patients with IBD in

flow cytometric tests. A significant increase of the histone activity in inflamed tissues of UC was only detected against *S. aureus*. The impact of the extracted histones seems to be strain-specific and higher against gram-positive species. As expected, extracellular histones could be detected in the mucus by immunohistological staining. Through ELISAs, protein concentrations of H2A and H2B were determined in the mucus and thus a slight increase of the histone proteins in UC was observed.

In the last part of this work, the interactions of recombinant histones among themselves and with other AMPs were analysed by flow cytometric viability assays. A strain-specific increase of the antimicrobial activity of histones among themselves and with AMPs was found. Thereby synergistic effects occurred frequently. The interactions of histones against several bacteria were visualised by electron microscope images and furthermore an agglutination of the microorganisms as well as a massive loss of cell integrity were detected.

Variations of the histones' transcriptome and the translome, as well as variations of the antimicrobial activity of histones in CED would have been evaluated as pathologic defects. However, in this work such effects could not be confirmed. Because of their enormous antimicrobial activity histones still play an important role in the protection against microorganisms in the colon. Further studies have to show, if histones possess a therapeutic potential, and if they can be used as new antibiotics. This work was able to verify the strong potential of histones against different pathogens, which is absolutely comparable with the potential of classic AMPs, and could promote inspiration for subsequent studies.

1 Einleitung

1.1 Der menschliche Darm

Der menschliche Darm beherbergt eine unglaubliche Anzahl von Mikroben. Auf seiner 300-400 m² großen Oberfläche wird er von bis zu 10¹⁴ Organismen kolonisiert. Diese mikrobielle Flora setzt sich aus mehr als 500 verschiedenen Spezies zusammen (Hooper 2009). Am häufigsten zu finden sind Organismen der Phyla *Firmicutes* und *Bacteroides* (Eckburg, et al. 2005, Hold, et al. 2002, Wang, et al. 2003, Hayashi, 2002). Bisher konnte das Ökosystem Darm nur teilweise charakterisiert und die Diversität der mikrobiellen Flora nur wenig definiert werden (Hooper und Gordon 2001). Aufgrund der enormen Zahl an Mikroorganismen ist eine duale Funktion der Mukosa besonders Wichtig: Zum einen muss die intestinale Barriere eine wirksame Schutzschicht gegen Pathogene bilden, zum anderen aber semipermeabel sein, damit Nährstoffe aufgenommen werden können (Macpherson und Uhr 2004). Auch eine exzessive Immunantwort gegen kommensale Mikroorganismen muss verhindert werden (Fukata und Abreu 2009), da Kommensale durch helfende Funktionen wie Celluloseverdau, Vitamin-K-Synthese und dem Besetzen von Nischen zur Darmgesundheit beitragen. Die Mukosabarriere setzt sich also aus komplexen spezifischen und unspezifischen Abwehrstrategien zusammen (Otte et al., 2003, Sansonetti 2004, Sanz und De Palma 2009).

1.1.1 Komponenten der intestinalen Mukosabarriere

Die intestinale Mukosa (*Tunica mucosa*) des Menschen besteht aus einer einlagigen, säulenförmigen Schicht von Epithelzellen, der darunter liegenden Bindegewebschicht *Lamina propria mucosae* und einer schmalen Gewebeschicht aus glatten Muskelzellen, der *Lamina muscularis mucosae*. Das Epithel der Mukosa erfüllt hochspezialisierte Funktionen innerhalb des Gastrointestinaltraktes, wie die Verdauung der aufgenommenen Nahrung, deren Resorption und die Verarbeitung zur Ausscheidung. Zwischen der Mukosa des Wirts und den Kommensalen, die im Darmlumen

die unverdaute Nahrung vergären, besteht eine empfindliche Balance, ein Mutualismus.

Vom Magen bis zum Rektum wird die Darmwand von sekretiertem Mukus bedeckt. Dieses komplexe Fluid ist reich an Mucin-Glycoproteinen und erreicht seine größte Dicke in Magen und Kolon (McGuckin, et al. 2011). Der Mukus besteht aus zwei Schichten: Einer äußeren, wenig kompakten Schicht, die ideales Habitat für die mikrobielle Flora ist, und einer inneren, sehr kompakten Schicht, frei von Mikroorganismen. Die Mukusdicke beider Schichten variiert im gesamten Gastrointestinaltrakt (Dicke der inneren Schicht durchschnittlich 50 μm und der äußeren Schicht 100 μm) (Johansson, et al. 2008 und 2011). Die innere Schicht ist an das darunterliegende Epithel angeheftet und beinhaltet eine Vielzahl diverser antimikrobieller Peptide. Der Mukus schützt das darunter liegende Epithel vor Austrocknung und erleichtert durch die Befeuchtung der Faeces deren Passage durch den Darm (McGuckin, et al. 2009).

Die primäre Barrierefunktion der Mukosa wird durch die Plasmamembran der eng miteinander verknüpften Epithelzellen aufrechterhalten. Sie erlaubt den Durchfluss von Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen, verhindert aber die Invasion von Fremdantigenen, Mikroorganismen und deren Toxinen (Groschwitz und Hogan 2009). Der parazelluläre Signalweg wird durch den apikalen *junctional complex* übermittelt, der aus den *tight junctions*, den darunterliegenden *adherens junctions* und den Desmosomen besteht (Schulzke, et al. 2009). Das Darmepithel setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen: Enterocyten (Sanz und De Palma 2009, Salim und Söderholm 2011), Gobletzellen, enteroendokrine Zellen und Panethzellen. Den prozentual größten Anteil bilden die absorbierenden Enterozyten. Die Gobletzellen sind spezialisiert auf die Sekretion von Mukuskomponenten. Die enteroendokrinen Zellen sind verantwortlich für die Ausscheidung von Peptidhormonen, die in Trophik, Gewebereparatur, Angiogenese, Enterozytendifferenzierung und Polarisierung entlang der Kryptenvilliachse involviert sind (Roda, et al. 2010, Goto und Kiyono 2012). Die Panethzellen enthalten eine hohe Anzahl sekretorischer Granula, die mit antimikrobiell aktiven Substanzen wie Lysozymen, Phospholipasen und α -Defensinen gefüllt sind. (Wehkamp und Stange 2010, Koslowski, et al. 2010, Bevins und Salzman 2011).

Die unter den Epithelzellen liegende *Lamina propria* enthält Immunzellen, wie Makrophagen, dendritische Zellen, Plasmazellen, Lymphozyten und in manchen Fällen auch Neutrophile. Diese Zellen exprimieren so genannte Pattern-recognition-Rezeptoren wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und Nucleotide binding oligomerisation domain-Rezeptoren (NODs), die innerhalb der angeborenen Immunabwehr spezifische Struktur motive (PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*), vor allem Peptidoglycan, Lipopolysaccharide und Flagellin, erkennen und auf diese Weise zwischen Pathogenen und Kommensalen unterscheiden können.

1.1.2 Abwehrmechanismen der intestinalen Mukosa

Das Immunsystem lässt sich funktionell in eine unspezifische, angeborene und eine spezifische, adaptive Abwehr differenzieren. Beide sind eng miteinander assoziiert und arbeiten synergistisch. Die unspezifische Abwehr spielt bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle und umfasst diverse Verteidigungsmechanismen, die der sofortigen und unspezifischen Abwehr von Mikroorganismen dienen (Bevins 2003, Hazlett und Wu 2011). Zu den darmeigenen Abwehrmechanismen gehören die Peristaltik (Howell, et al. 2003), die Gallensäureproduktion (Otte, et al. 2003), die Rekrutierung und Aktivierung natürlicher Killerzellen und Phagozyten (Biron, et al. 1999) sowie die Produktion antimikrobieller Peptide (AMPs) dazu (Wehkamp, et al. 2009).

Das Mikrobiom des Darms wird von apathogenen oder gelegentlich fakultativ pathogenen Bakterien gebildet. Diese Bakterien übernehmen eine maßgebliche Funktion für die Gesundheit, da sie mit Krankheitserregern um Nährstoffe und Adhäsionsstellen an der Darmwand konkurrieren. Zudem regulieren sie wichtige Barrierefunktionen, wie die des Darm-assoziierten Immunsystems (GALT, *Gut-associated lymphoid tissue*). Aufgabe dieser organisierten lymphatischen Strukturen ist es pathogene Mikroorganismen zu bekämpfen, gleichzeitig aber tolerant gegenüber Kommensalen zu sein. Im GALT enthalten sind B- (Gedächtnis- und Plasmazellen) und T-Lymphozyten. Dazu zählen die solitären Lymphfollikel, die Peyer-Plaques und die *Lamina propria* (Sanz und De Palma 2009). Die Peyer-Plaques wölben sich in die Darmschleimhaut hinein und haben über Mikrofaltenzellen (M-Zellen) engen Kon-

takt zum Darminhalt. Durch die M-Zellen werden Makromoleküle, Bakterien und Viren mittels Transzytose mit Zellen des lymphatischen Systems zusammengebracht.

1.2 Antimikrobielle Peptide (AMPs)

In der frühen Phase der immunologischen Abwehr gegen mikrobielle Erreger spielen die antimikrobiellen Peptide (AMPs) eine zentrale Rolle. Diese endogen gencodierten Peptide bestehen aus durchschnittlich 12 bis 50 Aminosäureresten und sind bei Säugern, Vögel, Amphibien, Invertebraten und Pflanzen weit verbreitet. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden mehr als 1500 AMPs beschrieben (Guaní-Guerra, et al. 2010, Wang und Wang 2004). Besonders stark werden sie in Phagozyten (speziell Granulozyten) und in verschiedenen Epithelmukosazellen exprimiert, wie denen der Haut, des Urogenital-, Respirations- und Gastrointestinaltraktes; in Grenzbereichen also die sich stets im Kontakt mit pathogenen und kommensalen Mikroorganismen befinden (Kübler, et al. 2006). Ihr Aktivitätsspektrum richtet sich gegen Bakterien, Pilze und einige Virenarten (Jenssen, et al. 2006).

Trotz der großen Zahl verschiedenster AMPs in der Natur und der daraus resultierenden Sequenzdiversität, gibt es übereinstimmende Strukturen, die vom Großteil der AMPs geteilt werden: Sie haben eine durchschnittliche Länge von 30 Aminosäureresten, sind kationisch, also positiv geladen (Nettoladung + 2 bis + 9) und amphiphil (= gleichzeitig lipo- und hydrophil). Diese Eigenschaften sind für die Interaktion der AMPs mit der mikrobiellen Membran verantwortlich und sind entscheidend für ihre antimikrobielle Aktivität. Der kationische Charakter der AMPs führt zu einer elektrostatischen Anziehung an die negativ geladenen Phospholipide der mikrobiellen Zellmembran. Ihre hydrophoben Eigenschaften fördern die Integration in die Membran und deren Durchdringung aufgrund der Ausbildung spannungsabhängiger Kanäle. Weiterhin erlaubt die amphipathische Struktur den Peptiden in wässrigen Umgebungen und Lipidmembranen löslich zu sein (Cederlund, et al. 2011, Wiesner und Vilcinskas 2010, Bevins 2003, Yeaman und Yount 2003). Aufgrund ihrer sekundären Strukturen, wie Größe, Konformation und Aminosäurezusammensetzung, lassen sie sich grob in vier Gruppen einteilen: 1. Amphiphile α -helikale Peptide ohne Cysteine (z.B. humanes Cathelicidin LL37, Frosch-Magainine und Cecropine

von Insekten und Schweinen), 2. Cystein-reiche, amphiphile β -Faltblatt-Peptide, stabilisiert durch intramolekulare Disulfidbrücken (z.B. Defensine und defensinähnliche Protegrine), 3. Lineare Peptide mit einer oder zwei dominanten Aminosäuren ohne Cysteine (z.B. PR-39 und das Tryptophan-reiche Indolicidin aus Rinder-Leukozyten) und 4. Loop-Peptide mit einer Disulfidbrücke mit und ohne amphiphilen Schwänze (z.B. Bactenecin aus Rinder-Granulocyten, Ranalexin und Brevinine aus Fröschen) (Martin, et al. 1995) (siehe Abbildung 1).

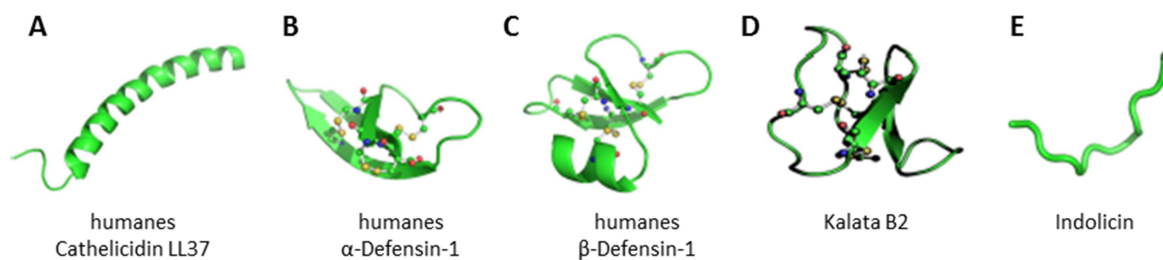


Abbildung 1 Überblick über die wesentlichen Strukturklassen der AMPs. (A) α -helikale Struktur des humanen Cathelicidins LL37, (B) β -Faltblattstruktur des humanen HNP-1, (C) gemischte α -helikale/ β -Faltblattstruktur von HBD-1, (D) zyklische Struktur des pflanzlichen Cyclotids Kalata B2 und (E) lineare Struktur des bovinen Indolicidins (nach Silva, et al. 2011).

Viele Hinweise lassen darauf schließen, dass AMPs neben der Zerstörung der Zellmembranintegrität von Mikroorganismen weitere oder komplementäre Mechanismen auslösen. So werden beispielsweise die Inhibierung der mikrobiellen Zellwandbiosynthese, die Inhibierung der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese (Hale and Hancock 2007), die Rekrutierung von Immunzellen (Kurosaka, et al. 2005, Niyonsaba, et al. 2002, Yang, et al. 2000a und 2000b), die Manipulation der Zytokin- und Chemokinexpression (Braff, et al. 2005), die Stimulation der Histaminausschüttung aus Mastzellen (Niyonsaba, et al. 2001) und die LPS-neutralisierenden Eigenschaften (Gough, et al. 1996, Scott, et al. 2000) mit AMPs in Verbindung gebracht. Auch die Förderung von Wundheilung und Zellproliferation konnte nachgewiesen werden (Murphy, et al. 1993, Aarbiou, et al. 2002a und 2004). Die bedeutendsten Familien der AMPs bei Säugetieren, die Defensine und die Cathelicidine, sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

1.2.1 Defensine

Defensine sind evolutionär gesehen eine sehr alte Klasse von AMPs. Sie sind kleine (Molekulargewicht von 3 bis 5 kDa), Arginin-reiche, kationische Peptide mit sechs hochkonservierten Cysteinresten. Durch die Ausbildung von drei Disulfidbrücken zwischen je zwei Cysteinresten kommt es zur Anordnung in eine Ringstruktur. Je nachdem an welcher Stelle Disulfidbrücken gebildet werden und in welcher Länge die Peptidsegmente vorliegen, unterscheidet man α - und β -Defensine (Ganz 2003, Müller, et al. 2005, Hazlett und Wu 2011) (siehe Abbildung 2).

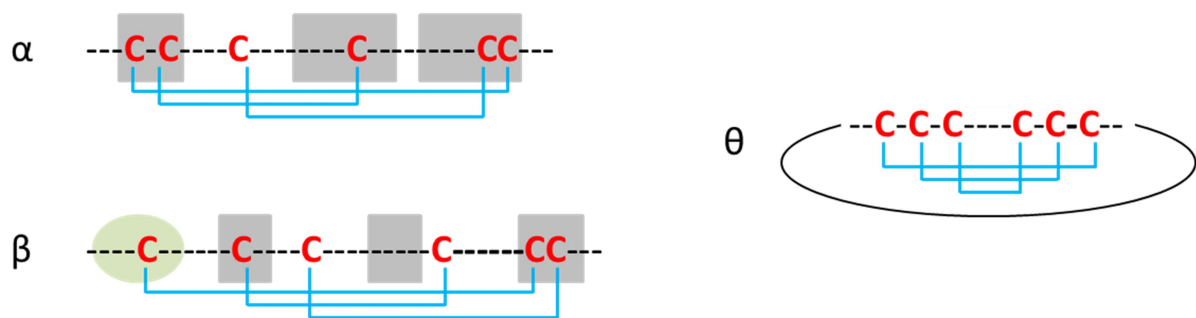


Abbildung 2 Schematische Darstellung der α -, β - und θ -Defensine. Die Defensine unterscheiden sich durch ihre jeweilig ausgebildeten Disulfidbrücken (blaue Linien) zwischen den sechs hochkonservierten Cysteinresten (rot). In α -Defensinen werden die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 1-6, 2-4 und 3-5 ausgebildet; in β -Defensinen zwischen den Cysteinen 1-5, 2-4 sowie 3-6. Aminosäuren, die α -Helices bilden sind grün und jene, die β -Stränge bilden sind grau unterlegt. Die θ -Defensine sind ringförmig aufgebaut (nach Yang, et al. 2002; Teile von Tabelle 1).

α - und β -Defensine werden als Vorläuferpeptide (Präpropeptide) synthetisiert, die proteolytisch in die jeweilige antimikrobiell aktive Form prozessiert werden (Lehrer 2004, Harwig, et al. 1992). Eine weitere Subfamilie, die θ -Defensine, wurden zuerst in Leukozyten von Rhesusaffen gefunden. Sie kommen lediglich bei Altweltaffen und nicht bei Menschen und Menschenaffen vor (Cole, et al. 2002, Nguyen, et al. 2003). Diese kleinen, zyklischen Defensine entstehen durch einen komplexen Spaltungsvorgang aus zwei verschiedenen mRNA-Vorstufen, die beide aus einem verkürzten α -Defensingen codiert werden (vorzeitiges Stoppcodon zwischen dem dritten und vierten Cysteincodon) (Tang, et al. 1999). Die translatierten Genprodukte werden verkürzt und an ihren Enden zusammengefügt, so dass ein komplett zyklisches Peptid mit insgesamt 18 Aminosäureresten, davon sechs Cysteinen und drei intramolekula-

ren Disulfidbrücken, entsteht (Lehrer und Ganz 2002, Tran, et al. 2002, Yang, et al. 2002).

Typische Defensinpeptide konnten in allen bisher untersuchten Säugetieren sowie in Hühnern und Truthähnen gefunden werden (Harwig, et al. 1994, Brockus, et al. 1998). Das Spektrum der antimikrobiellen Aktivität variiert bei den verschiedenen Defensinen, aber generell zeigen sie einen breiten Wirkungsbereich gegen Mikroorganismen, wie grampositive und -negative Bakterien, Pilze, Viren und Protozoa (Hazlett und Wu 2011, Mukherjee, et al. 2008).

1.2.1.1 α -Defensine

α -Defensine besitzen zwischen 29 und 35 Aminosäurereste und bilden charakteristische Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 1-6, 2-4 und 3-5 aus. Sie werden aus dreigeteilten Präpropeptidsequenzen codiert. Das daraus hervorgehende Vorläuferpeptid ist 90 bis 100 Aminosäuren lang und enthält eine Amino-(N)-terminale Signalsequenz (~ 19 AS), eine anionische Domäne (~ 45 AS) und eine Carboxy-(C)-terminale Signalsequenz mit dem reifen kationischen Defensin (~ 30 AS) (Daher, et al. 1988, Valore und Ganz 1992, Ganz 2003). In vielen Fällen sind die Ladungen der anionischen Domäne sowie des C-Terminus annähernd im Gleichgewicht (Michaelson, et al. 1992), was mutmaßlich bei der Proteinfaltung von Bedeutung ist und intrazelluläre Interaktionen mit der Membran verhindern könnte (Valore, et al. 1996).

Bisher konnten sechs humane α -Defensine identifiziert werden. Vier werden in Neutrophilen produziert, weshalb sie als humane neutrophile Defensine (HNP-1 bis 4) bezeichnet werden (White, et al. 1995). Gelagert werden sie in azurophilen Körnchen (Granula) und von stimulierten Neutrophilen und Makrophagen entlassen (Lehrer, et al. 1991a, Ganz, et al. 1990, Klotman and Chang 2006). Ursprünglich als Breitband-AMP identifiziert, konnten in jüngster Zeit weitere durch HNPs beeinflusste inflammatorische und immunologische Prozesse nachgewiesen werden, wie die Komplementaktivierung, die Zytotoxizität, die Chemotaxis von unreifen dendritischen Zellen, T-Zellen und Monozyten, die Induktion der epithelialen Zytokinaus-

schüttung sowie die Verstärkung der humoralen und zellulären Immunantwort (Aarbiou, et al. 2002b, Van Weterin, et al. 1999, Yang, et al. 2001).

Die α -Defensine 5 und 6 (HD-5 und -6) werden hauptsächlich in den Panethzellen des Dünndarms exprimiert (Hazlett und Wu 2011, Ouellette 2004, Mallow, et al. 1996), wurden aber auch im weiblichen Urogenitaltrakt gefunden (Quayle, et al. 1998). HNP-1, -2 und -3 zeigen *in vitro* eine potente antivirale Aktivität gegen Adenoviren sowie in etwas geringem Ausmaß gegen Papiloma-, Herpes-, Influenza- und Cytomegaloviren. Überdies inhibiert HNP-4 *in vitro* HIV-1-Infektionen (Klotman und Chang 2006).

1.2.1.2 β -Defensine

β -Defensine bilden charakteristische Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 1-5, 2-4 und 3-6 aus (Yang, et al. 2002, Oppenheim, et al. 2003). Bisher sind sechs humane β -Defensine (HBD-1 bis HBD-6) bekannt, deren Längen in einem Bereich von 36 bis 47 Aminosäureresten variieren (Raj and Dentino 2002, White, et al. 1995, Pazgier, et al. 2006, Taylor, et al. 2008).

HBD-1 wird als einziges β -Defensin konstitutiv exprimiert, vor allem entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes, aber auch im Respirations- und Urogenitaltrakt (Valore, et al. 1998). HBD-2 wurde zuerst aus psoriatischen Schuppen isoliert; es wird auch in der Haut und den Epithelien des Urogenital-, Gastrointestinal- und Respirationstraktes exprimiert (Raj und Dentino 2002). HBD-3 ist das Defensin mit der positivsten Nettoladung, es wurde ebenfalls aus Psoriasis-betroffener Haut isoliert (Harder, et al. 2001). Im Speichel und zervikovaginalen Flüssigkeiten wurden gleichfalls sehr hohe Konzentrationen festgestellt (Ghosh, et al. 2007). HBD-4 wurde in menschlichen Testikeln, dem Magen und dem Uterus nachgewiesen (García, et al. 2001); HBD-5 und -6 nur in humanen Epididymitiden (Yamaguchi, et al. 2002). Außer in Epithelzellen werden HBD-1 und HBD-2 in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Duits, et al. 2002).

Im menschlichen Genom wurden bisher 33 β -Defensingene identifiziert, die chromosomal in unterschiedlichen Clustern angeordnet sind (Schutte, et al. 2002, Rodríguez-Jimenez, et al. 2003, Pazgier, et al. 2006). Die β -Defensinsynthese verläuft auf ähnli-

che Weise wie die der α -Defensine. Die Struktur des Vorläuferpeptids ist einfacher zusammengesetzt und besteht aus einer Signalsequenz, einer kurzen oder fehlenden anionischen Domäne und dem reifen Defensinpeptid am C-Terminus (Ganz 2003).

β -Defensine sind sehr effektiv gegen gramnegative und -positive Bakterien, Viren und Pilze. So zeigte sich bei HBD-2 *in vitro* eine antimikrobielle Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *E. coli* (Harder, et al. 2000); bei HBD-3 gegen *S. aureus* (Chen, et al. 2005). HBD-1, -2 und -3 haben ebenfalls starke antimykotische Wirkung gegen *Candida albicans*, *C. krusei* und *C. parapsilosis* (Aerts, et al. 2008). β -Defensine können virale Infektionen auf verschiedenste Weise unterdrücken, z.B. durch Beschädigung der Virenhülle, Interaktion mit viralen Glycoproteinen und Rezeptoren, Inhibierung des Vireneintritts in die Zelle und Störung von Zellsignalen, die wichtig für die Virenreplikation sind (Klotman und Chang 2006). Außerdem ist HBD-3 ein Antagonist von CXCR-4, einem Korezeptor des HI-Virus; *in vitro* Studien zeigten eine Inhibierung der Virusreplikation durch HBD-3 (Feng, et al. 2006).

1.2.2 Cathelicidin

Die Familie der Cathelicidine ist im Vergleich mit den Defensinen recht klein. Außerhalb der Klasse der Säugetiere wurde sie nur vereinzelt, wie z.B. beim Haushuhn, gefunden, was auf eine recht junge evolutionsgeschichtliche Entstehung schließen lässt (Uzzell, et al. 2003, Zhu 2008). Als Cathelicidin wird eine Gruppe von AMPs definiert, die durch ein N-terminales Signalpeptid (29 bis 30 AS), ein hochkonserviertes Cathelin-ähnliches Propeptid (99 bis 104 AS) und einer strukturell sehr variablen C-terminalen antimikrobiellen Domäne charakterisiert ist (Zanetti, et al. 1995). Die Cathelicidingene werden als Präpropeptide aus vier Exons transkribiert, wobei die ersten drei Exons für das Signalpeptid sowie die Cathelin-ähnlichen N-terminale Domäne und das vierte Exon für den C-Terminus codiert. Viele Spezies besitzen mehrere Cathelicidinhomologe, beispielsweise Schweine-, Pferde-, Rinder- und Vogelarten (Bals und Wilson 2003). Bei anderen Spezies ist nur eine Kopie des Cathelicidins vorhanden, wie bei Maus- (*mCRAMP* in der Maus; *rCRAMP* in der Ratte) und Kaninchenarten (*CAP18*) sowie bei Primaten (*CAMP* im Menschen). Die Sequenz der N-terminalen Domäne ist hochkonserviert und zeigt eine Sequenzhomologie mit

dem porcinen Cystein-Protease-Inhibitor Cathelin (Zaiou, et al. 2003). Im Vergleich dazu sind die Sequenzen der C-terminalen antimikrobiellen Domänen divergent; sie codieren AMPs in verschiedenen Längen (12 bis 79 AS) und Faltungen. Dabei zeigt sich eine gewöhnliche Konformation eines linearen Peptids, das eine amphipathische α -helikale Struktur in Kontakt mit Lipidmembranen annimmt (Gennaro und Zanetti 2000, Tomasinsig und Zanetti 2005). Auch im Menschen konnte bis dato nur ein Cathelicidin identifiziert werden, welches als hCAP18 (*human cationic protein of 18 kDa*) bezeichnet wird (Larrick, et al. 1994, Zanetti, et al. 1995, Cowland, et al. 1995, Agerberth, et al. 1995, Bals und Wilson 2003). Eine Spaltung des hCAP18 zwischen den Aminosäuren Ala103 und Leu104 führt zur Bildung eines 37 Aminosäure langen antimikrobiellen Peptids, LL37, mit zwei Leucin-Resten am N-Terminus (Gudmundsson, et al. 1996, Sorensen, et al. 2001). In hohen Konzentrationen findet man LL37 in spezifischen Granula von Neutrophilen und es wird in Epithelzellen der Haut und der Mukosa des Darm-, Respirations- und des Urogenitaltraktes exprimiert. Ferner konnte dieses Peptid in natürlichen Killerzellen, Monozyten, B-, T- und Mastzellen detektiert werden (Cowland, et al. 1995, Gudmundsson, et al. 1996, Frohm, et al. 1997, Ganz und Lehrer 1998, Bals, et al. 1998, Agerberth, et al. 2000, Niyonsaba, et al. 2002, Di Nardo, et al. 2003).

LL37 ist sehr wirksam gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen, das dem der Defensine ähnelt. Es ist antimikrobiell aktiv gegen eine Vielzahl von gramnegativen und -positiven Bakterien, Pilzen und Viren (Zanetti, et al. 1995, Bals, et al. 1998 und 1999). Weiterhin zeigte sich, dass es Lipopolysaccharide neutralisieren kann (Zanetti, et al. 1995, Larrick, et al. 1994, Kirikae, et al. 1998, Scott, et al. 2002) und Mastzellen, Phagozyten, Epithel- sowie Endothelzellen aktiviert (Scott, et al. 2002, Niyonsaba, et al. 2001, Koczulla, et al. 2003), um so die Chemotaxis der Phagozyten, T- und Mastzellen zu induzieren (Yang, et al. 2000b, Niyonsaba, et al. 2002). Zudem fördert LL37 die Wundheilung und Angiogenese (Dorschner, et al. 2001, Heilborn, et al. 2003). In einer neueren Studie zeigte sich, dass LL37 in der Lage ist den periplasmatischen Zwischenraum von gram-negativen Bakterien zu erreichen, um so das bakterielle Wachstum zu verzögern (Sochacki, et al. 2011).

1.2.3 Antimikrobiell wirksame Peptide im Kolon

Der menschliche Dickdarm beherbergt eine enorme Menge an Mikroorganismen. Um den Körper vor Infektionen zu schützen, ist ein gesundes und unbeschädigtes Epithel Voraussetzung. Neben der Funktion als mechanische Barriere sind die Epithelzellen an der Immunregulation beteiligt und synthetisieren biologisch aktive Mediatoren, wie Zytokine, Chemokine, Prostaglandine und Stickoxide (Kagnoff und Eckmann 1997). Diese Substanzen regulieren eine koordinierte Immunantwort der Mukosa. Von den Epithelzellen wird auch eine komplexe Mischung aus verschiedenen AMPs exprimiert, die in der Lage sind eindringende Mikroorganismen zu zerstören. Nachgewiesen werden konnte bisher die Produktion der AMPs LL37 (Hase, et al. 2002, Islam, et al. 2001) sowie die der Defensine, besonders der β -Defensine (O'Neil, et al. 1999, Fahlgren, et al. 2003 und 2004, Wehkamp, et al. 2002 und 2003). LL37 und HBD1 werden konstitutiv im Dickdarmgewebe exprimiert, während die Defensine HBD2, -3 und -4 bei Entzündungen induziert werden (O'Neil, et al. 1999). Daneben konnten weitere antimikrobiell aktive Polypeptide aus Kolongewebe isoliert werden, wie beispielsweise die ribosomalen Proteine Ubiquicidin, L30, S19, das eosinophile kationische Protein, Phospholipase A₂ und die Mitglieder der Histonfamilie (Howell, et al. 2003, Tollin, et al. 2003).

Ubiquicidin konnte unter anderem aus aktivierten Makrophagen bei Mäusen isoliert werden. Es zeigt eine primäre Aminosäuregemeinsamkeit mit dem Vorläufermolekül von Ubiquitin und eine starke antimikrobielle Aktivität gegen *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* und *S. aureus* (Hiemstra, et al. 1999). Das ribosomale Protein L30 hat eine N-terminale Sequenzgemeinsamkeit mit RpL1, einem antibakteriellen Protein von *Helicobacter pylori* und ist antimykotisch gegen *C. albicans* (Pütsep, et al. 1999, Lee, et al. 2002). Ein weiteres Polypeptid mit antimikrobieller Aktivität ist S19, das dimerisieren kann und als ein chemischer Lockstoff für Monozyten operiert (Nishiura, et al. 1996). Die antimikrobiell aktive Phospholipase A₂ (PLA₂) konnte bereits in vielen Geweben und Sekreten, wie Panethzellen (Nevalainen, et al. 1995) und Neutrophilen (Rosenthal, et al. 1995), gefunden werden. Sie ist das wichtigste Bakterizid gegen grampositive Bakterien in menschlichen Tränen (Qu und Lehrer 1998).

Die antimikrobiellen Eigenschaften von Histonen sind seit vielen Jahrzehnten bekannt (Miller, et al. 1942, Hirsch 1958). Fragmente von Histon H1 mit antimikrobieller Aktivität konnten im Dünndarm nachgewiesen werden (Rose, et al. 1998). Eine spätere Studie von Kim et al. zeigte weitere extranukleäre antimikrobielle Eigenschaften der Histone. Sie isolierten Buforin, ein antimikrobielles Peptid, aus dem Magen der asiatischen Kröte *Bufo bufo gargarizans*, ein Fragment des Histons H2A (Kim, et al. 2000). Da in verschiedenen Arbeiten die antimikrobiellen Eigenschaften der Histone festgestellt wurden, liegt der Verdacht nahe, dass sie eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielen.

1.3 Histone

Histonproteine, die sich zu den Kern-Oktamer-Komplexen zusammenfügen, bilden die fundamentalen Organisationseinheiten der eukaryotischen Chromosomen. Man unterscheidet fünf Histonklassen (siehe Tabelle 1): H1, H2A, H2B, H3 und H4. Sie lassen sich durch ihre relative Molekülmasse, den Gehalt an Arginin und Lysin und durch die Lokalisation der basischen Aminosäuren innerhalb der jeweiligen Polypeptidkette (bei H1 liegen diese an den beiden Enden der Kette; bei den restlichen Histonen gehäuft am N-terminalen Ende vor) differenzieren (Fredericq 1976, Sautière, et al. 1975).

Tabelle 1 Merkmale der fünf Histonklassen

Bezeichnung	Rel. Molekülmasse [kDa]	Lysin und Arginin [mol%]	Modifikationen	Bemerkung
H1	22 - 24	28,6	Ph, Ac	Sehr reich an Lysin; fehlt bei Hefen
H2A	14,0	20,2	Ph, Ac, ADP-R	Reich an Lysin
H2B	13,8	21,6	Ac	Reich an Lysin
H3	15,3	23,0	Ac	Reich an Arginin
H4	11,3	23,5	Ac	Reich an Arginin

* Ph=Phosphorylierung (OH-Gruppen von Serin und Threonin); Ac=Acetylierung (ϵ -Aminogruppen von Lysin; ADP-R=ADP-Ribosylierung (Glutaminsäurereste) (nach Spektrum Akademischer Verlag, 1999).

1.3.1 Das Nukleosom

In eukaryotischen Zellen wird die genomische DNA durch die Histone hierarchisch als Chromatin organisiert. Grundlegende Einheiten sind dabei die Nukleosomen, welche jeweils aus dem Kernpartikel und der Linker-DNA bestehen. Im Zentrum des Kernpartikels befindet sich ein Oktamerkomplex der Kernhistone, das sich jeweils aus zwei der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt. Das Oktamer besteht aus einem zentralen Tetramer, das aus zwei Molekülen des Histons H3 und zwei Molekülen H4 aufgebaut ist und an jeder Seite von einem Dimer aus je einem Molekül H2A und einem Molekül H2B flankiert wird (Eslami-Mossallam, et al. 2016, Zuh und Li 2016). Das Oktamer ist annähernd zylinderförmig mit einem Durchmesser von ca. 70 Å und einer Breite von 55 bis 57 Å. Es ist in der Lage 145-147 bp DNA (Luger, et al. 1997, Davey, et al. 2002, Makde, et al. 2010) in einer 1.75 linksgewundenen Drehung um den Proteinkomplex herum zu binden (Finch, et al. 1977, Klug und Lutter 1981, Smith 1991) (siehe Abbildung 3).

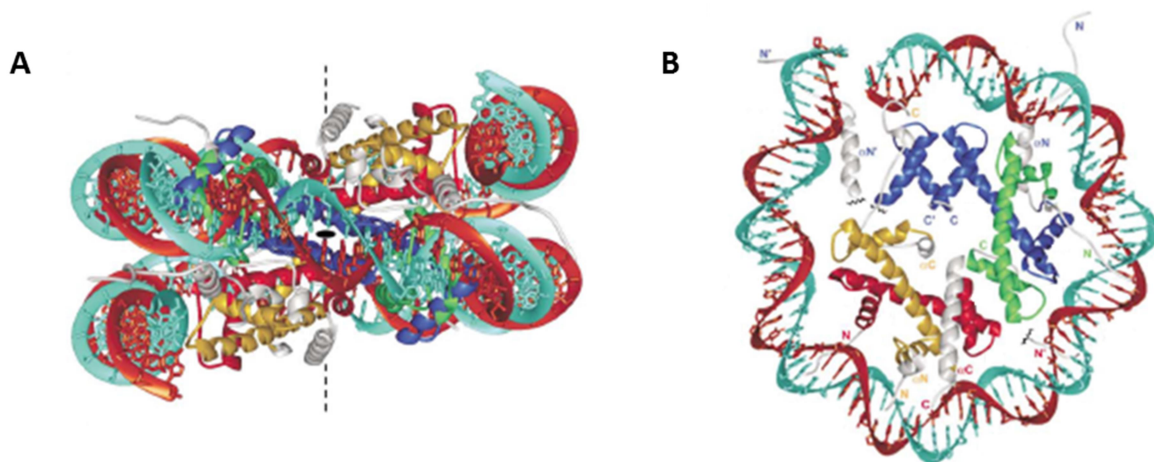


Abbildung 3 Überblick und Hauptmerkmale der Nukleosomstruktur. (A) Blick an der Achse der 2-fachen Pseudo-Symmetrie (Dyadenachse schwarz) entlang mit der DNA-Superhelix, die sich vertikal orientiert (gestrichelte Linie). Die Dyadenachse halbiert das zentrale Basenpaar. Die DNA-Stränge wurden türkis und braun markiert. Die Histonbindungsdomänen mit den Histonen wurden ebenfalls farblich markiert: H2A (gelb), H2B (rot), H3 (blau) und H4 (grün). Die N-terminalen Schwanzregionen wurden weiß markiert. (B) Diese Abbildung zeigt die Hälfte der Struktur, um die Organisation der Histone und der DNA zu verdeutlichen (nach Davey, et al. 2002).

Die Histonproteine sind überwiegend positiv geladen, was dazu führt, dass sie mit negativ geladenen Oberflächen, wie der nukleosomalen DNA leicht Verbindungen

eingehen können (Bannister und Kouzarides 2011, Iwasaki, et al. 2013). Neben ihrer allgemeinen positiven Ladung besitzen die H2A- und H2B-Kernhistone negativ geladene Glutamatreste, die miteinander fusionieren und auf diese Weise den sogenannten „acidic patch“ bilden. Strukturelle Studien zeigen die große Bedeutung dieser Region für die Proteininteraktion. Der Histon-H4-Schwanz stellt beispielsweise eine Verbindung mit dem Patch her und begünstigt ein inter-nukleosomales Netzwerk, das mit der Chromatinkondensation assoziiert ist (Dorigo, et al. 2003, McBryant, et al. 2009). Die flexiblen Schwänze der Histonproteine sind wichtige Merkmale der Nukleosomen, da sie die Hauptangriffspunkte der epigenetischen Modifikationen darstellen. Dabei sind viele Kombinationen und Modifikationen möglich, wobei individuelle Nukleosomen sich ebenfalls in Strukturen mit einer höheren Ordnung organisieren können. Nukleosompartikel zeigen multiple chemische und topologisch ausgeprägte Bindungsstellen, die den Schlüssel für die Erkennungsprozesse darstellen (Speranzini, et al. 2016).

Benachbarte Nukleosomenpartikel sind wie Perlen an einer Schnur aus histonfreier Linker-DNA miteinander verbunden und bilden auf diese Weise das „beads-on-a-string“ genannte nukleosomale Feld mit einem Durchmesser von 11 nm. Diese Felder werden wiederum durch die Linkerhistone H1 und H5 in einer noch weiter kondensierten 30-nm Chromatin-Faser organisiert, die als sekundäre Chromatinstruktur betrachtet wird (Li und Reinberg 2011, Zuh und Li 2016).

1.3.2 Extranukleäre Histonaktivität

Seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, dass Histone wirksame Antibiotika sind (Miller, et al. 1942), die Bakterien bereits in nanomolaren Konzentrationen abtöten und dabei viel effektiver sind als die meisten anderen AMPs (Hirsch 1958). Wie bereits erwähnt konnten Histonfragmente als antimikrobieller Wirkstoff aus dem Magen von Kröten (Park, et al. 1996, Cho, et al. 2008) isoliert werden. Auch bei anderen aquatischen Tieren erfüllen Histonfragmente eine entsprechende Rolle (Park, et al. 1998, Birkemo, et al. 2003 und 2004, Kawasaki, et al. 2003, Patat, et al. 2004, Lüders, et al. 2005, Dorrington, et al. 2011, Noga, et al. 2011). Bei Säugetieren konnten extrazelluläre Histone bereits im Zytoplasma, auf der Zelloberfläche und in den so genannten NETs

(*neutrophil extracellular traps*) nachgewiesen werden (Parseghian und Luhrs 2006, Urban, et al. 2009). Über den Mechanismus der Histontoxizität ist bisher wenig bekannt. Allerdings lässt sich vermuten, dass Histone durch ihre kationische Ladung an mikrobielle Membranen binden und diese so zerstören.

Wie bereits erwähnt entlassen Neutrophile als Antwort auf bakterielle Produkte sogenannte NETs, die aus DNA, Histonen, neutrophilen Enzymen und bakteriellen Molekülen zusammengesetzt sind. Die Ultrastruktur der NETs ist untypisch: Sie besitzen glatte Filamente mit einem Durchmesser von ca. 17 nm (Brinkmann, et al. 2004), die sich aus gestapelten und modifizierten Nukleosomen zusammensetzen (Urban, et al. 2009). Dieses Rückgrat ist gespickt mit 50 nm großen globulären Domänen aus granularen Proteinen. Durch Steinberg und Grinstein wurde 2007 für den Mechanismus der NET-Bildung der Begriff „NETosis“ geprägt. Um die NETs zu entlassen erfahren aktivierte Neutrophile drastische Modifikationen: Sie heften sich an die Substratoberfläche an und mobilisieren granulare Komponenten wie die Proteasen NE (Neutrophile Elastase) und MPO (Myeloperoxidase). Daraufhin werden Histone im Nukleus prozessiert und die intrazelluläre Membran desintegriert. Schlussendlich zerreißt die Zellmembran und eine Mischung aus Nukleoplasma sowie Zellplasma wird ausgestoßen und bildet NETs (Fuchs, et al. 2007) (siehe Abbildung 4).

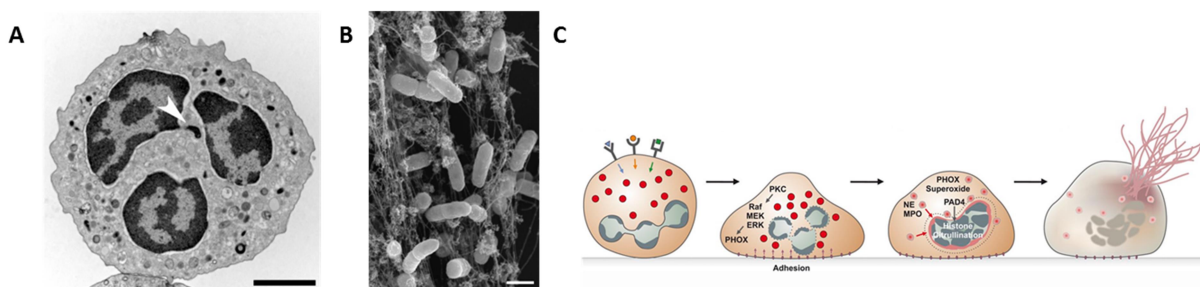


Abbildung 4 Neutrophile und NETs. (A) Transmissionselektronenmikroskopisches Bild eines humanen Neutrophils. Dieser Zelltyp enthält verschiedene Granula im Zytoplasma (Maßeinheit 2 μ m). (B) Elektronenmikroskopie von humanen Neutrophilen, die mit Salmonella inkubiert wurden. Die Bakterien sind gefangen in NETs (Maßeinheit 1 μ m). (C) Schematische Zeichnung des NETosis-Stoffwechselwegs: Stimulation des Rezeptors - Anheftung der Neutrophile an die Substratoberfläche - Mobilisierung von Proteasen - Verarbeitung der Histone - Desintegration der intrazellulären Membran - Ruptur der Zellmembran - explosionsartige Ausschüttung von Nukleoplasma und Zellplasma - Bildung von NETs (nach Brinkmann & Zychlinsky, 2012).

Viele physiologische NETosis-Auslöser konnten bereits beschrieben werden, wie Infektionen mit Bakterien, Pilzen, HIV-Parasiten sowie ROS-ähnliche Hydrogenperoxide (Urban, et al. 2006, Fuchs, et al. 2007, Grinberg, et al. 2008, Saitoh, et al. 2012). Außer bei Säugetieren konnte die NET-Synthese durch Neutrophile und neutrophil-ähnliche Strukturen auch bei Fischen (Palic, et al. 2007) und Vögeln (Chuammitri, et al. 2009) nachgewiesen werden. Sogar in Pflanzen wird bei Infektionen durch spezialisierte Zellen auf der Wurzeloberfläche Chromatin entlassen (Hawes, et al. 2011). Diese Beispiele lassen vermuten, dass Chromatin zwei Funktionen besitzt: Die Organisation der DNA und eine Schutzfunktion gegen Pathogene.

An dieser Stelle muss angeführt werden, dass Histone ebenfalls signifikante pathogene Effekten außerhalb der Zellen hervorrufen können (Gupta, et al. 2010, Saffarzadeh, et al. 2012). Klinische und experimentelle Daten lassen vermuten, dass extrazelluläre Histone eine neue Klasse von DAMPs (*Damage-associated molecular pattern molecules*) repräsentieren, die dem Wirt durch multiple Mechanismen Schaden zufügen können (Hou, et al. 2013, Tang, et al. 2012). Die Ergebnisse aus Patienten- sowie Tiermodellen zeigen, dass Histone eine entscheidende Rolle bei Sepsis und ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) (Chaput und Zychlinsky 2009, Xu, et al. 2009, Zhang, et al. 2013) spielen. Inzwischen finden sie dort bei der Diagnose als neue Biomarker Verwendung. Des Weiteren zeigte sich ebenfalls, dass die Gabe von 75 mg/kg Histon aus Kalbsthymus Mäuse innerhalb einer Stunde nach Injektion tötet (Xu, et al. 2009). Außerdem sind Histone in der Lage sterile Entzündungen durch Steigerung der DNA-aktivierten TLR-9-Signalkaskade und durch Aktivierung der NLRP3-Inflammasome hervorzurufen (Huang, et al. 2011, Allam, et al. 2013). Dies könnte ein weiteres Beispiel für einen Immuneffektor-induzierten Kollateralschaden sein.

1.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zur Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gehören Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Beide Subtypen sind gekennzeichnet durch rezidivierend auftretende Entzündungen des Gastrointestinaltraktes, die durch die intestinale Lokalisation und die Art der Entzündung unterschieden wer-

den. CU wird durch eine kontinuierliche Entzündung des Dickdarms ausgehend vom Rektum definiert, die auf das Kolon beschränkt ist. Bei MC dagegen können die Entzündungen im gesamten Gastrointestinaltrakt vom Mund bis zum Anus auftreten, wobei diese häufig segmental („*skip lesions*“) vorzufinden sind. Histologisch gesehen unterscheiden sich die Läsionen zwischen den beiden Krankheitsbildern ebenfalls. Während die Entzündung bei CU lediglich auf die Mukosaschicht beschränkt ist, zeigt sich bei MC eine transmurale Entzündung (Ha und Khalil 2015, Gasche, et al. 2000).

Beide Krankheitsbilder sind charakterisiert durch Phasen der Remission und Episoden klinischer Rezidive. Behandlungen zielen primär darauf ab die Entzündungen während eines Schubs zu reduzieren und die Remissionsphasen zu verlängern. Trotz der relativ guten Behandlungsmöglichkeiten klagen die Patienten über signifikante Behinderungen ihrer Lebensgewohnheiten und täglichen Aktivitäten (Van der Have, et al. 2014, Devlen, et al. 2014). Zu den wichtigsten klinischen Symptomen gehören Diarrhoe, abdominale Schmerzen, Fieber und rektale Blutungen (Levine, et al. 2014). Patienten mit CU haben zusätzlich häufig blutige Durchfälle (Baumgart 2009). Die transmuralen Entzündungen können oft zu Strikturen und Fisteln zwischen dem Darm und anderen abdominalen Organen und sogar der Haut führen (Van Limbergen, et al. 2008, Jose, et al. 2009). Zu den häufigsten Formen dieser extraintestinalen Manifestationen gehören muskuloskeletale, dermatologische, okuläre sowie hepatobiliäre Veränderungen (Biancone, et al. 2008, Caprilli, et al. 2006, Bernstein, et al. 2001). Aktuell gibt es eine Vielzahl von medikamentösen Therapien zur Behandlung von MC und CU, beispielsweise 5-Aminosalicylsäuren (5-ASA), Kortikosteroide bzw. Kortisonpräparate, Immunsuppressiva, Biologika und Antibiotika (Park, et al. 2014, Feagan, et al. 2007, Loftus, et al. 2008, Kammermeier, et al. 2015).

1.4.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts ließ sich eine signifikante Zunahme von CED beobachten, die je nach Land den Faktor 2 bis 7 betrug (Stange 2013). Die höchsten Inzidenzraten wurden in Nordeuropa (Vind, et al. 2006, Shivananda, et al. 1996), Großbritannien (Rubin, et al. 2000, Yapp, et al. 2000) und Nordamerika (Loftus, et al. 2007,

Bernstein, et al. 2006) festgestellt, wobei in diesen Ländern mutmaßlich aktuell ein Plateau erreicht wurde (Molodecky, et al. 2012), während in Entwicklungsländern die Zahlen weiter steigen (Ng, et al. 2013, Hou, et al. 2009, Thia, et al. 2008). Aufgrund dessen gehen einige Studien davon aus, dass die steigende Industrialisierung dieser Länder einen Einfluss auf die Prävalenz von CED haben könnte. So zeigte sich bei Menschen, die in stärker entwickelte Länder emigrierten, ein erhöhtes Risiko CED zu entwickeln. Dieses Risiko stieg in der ersten Nachkommengeneration nochmals an (Bernstein und Shanahan 2008).

Genomweite Assoziations- (GWAS, *genome wide association studies*) und Populationsbasierte Studien lieferten wichtige Beweise dafür, dass auch genetische Faktoren einen Beitrag zur Pathogenese von CED leisten. So haben beispielsweise Verwandte von CED-Patienten ein 8- bis 10-fach erhöhtes Risiko diese Krankheiten zu bekommen. Vor allem aber gibt es eine Konkordanz zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen, wobei für den gesunden Zwilling ein 26-fach erhöhtes Risiko an MC und ein 9-fach erhöhtes Risiko an CU zu erkranken besteht (Tysk, et al. 1988, Uhlig, et al. 2014). Trotzdem konnten diese Studien nur etwa 25 % der genetischen Risikofaktoren identifizieren, die zu CED führen können (McGovern, et al. 2010, Imielinski, et al. 2009, Barrett, et al. 2008). Im Umkehrschluss müssen für die Entstehung von CED neben der genetischen Disposition noch andere Ursachen zu Grunde liegen (Mack 2011, Bernstein und Shanahan 2008).

Durchschnittlich tritt MC im Alter von 20 bis 30 Jahren und CU im Alter von 30 bis 40 Jahren zum ersten Mal auf. Das lässt vermuten, dass Umweltfaktoren ebenfalls eine große Rolle spielen könnten (Cosnes, et al. 2011). Viele Studien zeigen, dass die westliche Ernährung mit wenig Ballaststoffen, viel Zucker und viel tierischen Fetten zur Pathogenese von CED beiträgt (D'Souza, et al. 2008, O'Sullivan und O'Morain 2006, Mahmud und Weir 2001). Auch die größere Hygiene in den Industrienationen könnte einen Einfluss haben (De Silva, et al. 2008). Als mögliche Ursache wird ferner die Zunahme der Antibiotikagabe in der Kindheit diskutiert (Hviid, et al. 2011, Shaw, et al. 2010). Im besonderen Verhältnis zu CED steht der Konsum von Tabak, der als einziger Umweltfaktor einen modifizierbaren Effekt auf die Krankheit aufweist. Bei aktiven (Persson, et al. 1990) und passiven Rauchern (Jones, et al. 2008) mit MC ist

bekannt, dass sie einen komplizierteren Krankheitsverlauf entwickeln (Somerville, et al. 1984). Im Gegensatz zum schädlichen Effekt bei MC-Patienten scheint das Rauchen einen schützenden Einfluss auf CU zu haben (Abraham, et al. 2003, Birtwistle 1996), da diese Patienten einen sanfteren Krankheitsverlauf entwickeln (De Bie, et al. 2015, Persson, et al. 1993). Darüber hinaus können auch Störungen der immunologischen Balance, z.B. durch eine Überreaktion gegen kommensale Mikroorganismen oder durch eine zerstörte Mukusbarriere, initiiierend und nachhaltig wirken (Swidsinski, et al. 2009).

1.4.2 Genetische Disposition

In den letzten Jahren konnten viele Gene identifiziert werden, die einen Beitrag zur Entstehung von CED leisten. Als erstes Suszeptibilitätsgen für MC wurde 2001 *Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2)* identifiziert. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das vor allem in Monozyten, dendritischen Zellen und intestinalen Epithelzellen als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Produkte synthetisiert wird. Als so genannter *pattern recognition receptor (PRR)* erkennt es bakterielle Muramyl-Dipeptide und initiiert nach Erkennung der Fremdstoffe den NF- κ -B-Signalweg. Die Aktivierung dieses Signalwegs induziert als Immunantwort die Autophagie der dendritischen Zellen. Die dendritischen Zellen von Personen mit einem veränderten NOD2-Gen zeigen eine fehlerhafte Autophagieinduktion und eine reduzierte Lokalisation von Bakterien in Autophagosomen (Cooney, et al. 2010). Genetische Analysen zeigten, dass zwei weitere Gene, *IRGM* und *ATG16L1* ebenfalls bedeutend für die Autophagie sind. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen dem Gen *IL23R* und CED hergestellt werden (Duerr, et al. 2006). *IL23R* kodiert für eine Untereinheit des pro-inflammatorischen Zytokin-Interleukin-Rezeptors (IL)-23, einem Peptid, das in die Bildung von Th17-Zellen involviert ist. *IL23R* und weitere Suszeptibilitätsloci, wie *IL12B*, *JAK2* und *STAT3*, konnten in Zusammenhang mit MC und CU gebracht werden (Anderson, et al. 2011, Brand 2009). Defekte in *IL-10* sind mit MC und CU assoziiert (Tremelling, et al. 2007). Weitere Suszeptibilitätsgene, die die Immunfunktion regulieren sind *CARD9*, *IL1R2*, *REL*, *SMAD3* und *PRDM1*. Die bislang größte genetische Studie, die mehr als 75 000 CED-Patienten und Kontrollen

untersucht hat, identifizierte 163 Suszeptibilitätsloci. Dabei waren 110 Gene Risikofaktoren für beide Erkrankungen, 30 Loci speziell mit MC und 23 Loci nur mit CU assoziiert (McGovern, et al. 2015, Liu, et al. 2015). Im Hinblick auf die Erbllichkeit machen die identifizierten Gene zwar nur einen geringen Prozentsatz aus, zeigen aber das vorhandene genetische Risiko an CED zu erkranken.

1.4.3 Mikrobielle Faktoren

Das menschliche Mikrobiom entwickelt sich innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt und bleibt ab dann recht stabil. Die Darmbakterien, die bisher kultiviert werden können, repräsentieren nur ca. 20 bis 30 % der gesamten fäkalen Bakterienspezies. Die übrigen Darmbakterien stellen zu komplexe Ansprüche an ihre anaerobe Umwelt (Langendijk, et al. 1995, Hayashi, et al. 2002). Trotzdem konnten bereits Unterschiede der mikrobiellen Flora zwischen Gesunden und CED-Patienten nachgewiesen werden (Eckburg, et al. 2005, Hakansson und Molin 2011). Viele Studien stellten bei Menschen mit MC und CU einen erheblichen Unterschied der Darmflora in entzündeten und nicht-entzündeten Darmsegmenten fest (Joossens, et al. 2011, Andoh, et al. 2011). So zeigen CU-Patienten trotz einer erhöhte Bakterienzahl in der Mukosa (Pullan, et al. 1994) eine geringere Bakterienvariabilität (Nishikawa, et al. 2009). Außerdem konnte bei CED eine erhöhte Bakterienassoziation an die Darmmukosa festgestellt werden (Ott, et al. 2004), bei MC-Patienten dagegen eine gesteigerte Anheftung von *E. coli* (Frank, et al. 2007, Martinez-Medina, et al. 2006).

Viele pathogene Mikroorganismen wie Listerien, Mycobakterien, Hefepilze und Marnerviren wurden in der Literatur als mögliche Ursache für CED diskutiert. Bisher konnte jedoch kein spezifischer Krankheitserreger identifiziert werden (Lidar, et al. 2009, Eckburg und Relman 2007). Vielmehr scheint die mikrobielle Flora des Darms in ihrer Gesamtheit die Entzündung auszulösen, was ebenfalls in verschiedenen klinischen und tierexperimentellen Studien gezeigt werden konnte. Die Vermutung, dass kommensale Darmbakterien Entzündungen in einem suszeptiblen Wirt initiieren und aufrechterhalten können, basiert auf den Ergebnissen der Studie von Taurog et al., die zeigen konnten, dass HLA-B27 transgene Ratten spontan eine chronische Colitis entwickelten, wobei die selben Ratten unter keimfreien Bedingungen nicht

erkrankten (Taurog, et al. 1994). In einer weiteren Studie von Sellon et al. konnte an keimfrei gehaltenen Interleukin-10-Knockout-Mäusen ebenfalls gezeigt werden, dass erst durch die Anwesenheit von bakterieller Darmflora eine Colitisentwicklung folgt (Sellon, et al. 1998).

Firmicutes und *Bacteroides* sind die zwei vorherrschenden Phyla im gesunden menschlichen Darmtrakt. Im Gegensatz dazu ist das Mikrobiom von CED-Patienten durch einen relativen Mangel dieser beiden Phyla charakterisiert. Stattdessen zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen von Enterobakterien bei MC, eine Reduktion von *Clostridium spp.* und eine Zunahme von *E. coli* bei CU (Martinez, et al. 2008). Auch die Studien von Frank et al. konnten ein reduziertes Vorkommen der dominanten Spezies des Darmmikrobioms nachweisen. Bei Mukosabiopsien von MC- und CU-Patienten konnte eine geringere Menge an 16S rRNA-Sequenzen der assoziierten *Firmicutes*- und *Bacteroides*-Spezies aber eine gleichzeitige Zunahme der 16 S rRNA-Sequenzen von *Proteobacteria* und *Actinobacteria* festgestellt werden (Frank, et al. 2007). Die Zusammensetzung der Darmflora spielt also eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CED. Durch FISH-Analysen konnte die Arbeitsgruppe Swidsinski et al. ein höheres Vorkommen mukusadhärenter und zum Teil invasiver Bakterien der luminalen Darmflora bei CED-Patienten nachweisen. Bei fast allen untersuchten Patienten zeigte sich ein dichter Bakterienfilm auf der intestinalen Oberfläche, der aus über 60 % *Bacteroides fragilis* und *Enterobacteriaceae* bestand. Die Bakterien haften direkt an den Epithelzellen, drangen in die Krypten ein und wurden sporadisch auch intrazellulär nachgewiesen (Swidsinski, et al. 2009). Auf der anderen Seite zeigen experimentelle Daten und klinische Beobachtungen, dass die komplexe mikrobielle Flora bei der Entwicklung von Entzündungen in der Mukosa eine wichtige Rolle spielt (Sartor, et al. 1996). So sind einige Kommensale des Darms, wie z.B. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Saccharomyces*, effektiv bei der Aufrechterhaltung der Remission bei CU, was als anti-inflammatorischer Effekte interpretiert werden kann. Des Weiteren konnte bei CED-Patienten eine niedrigere Anzahl kurzkettiger Fettsäuren in fäkalen Extrakten nachgewiesen werden (Marchesi, et al. 2007). Wie bereits erwähnt, kann eine divergente Zusammenstellung der mikrobiellen Flora zu physiologisch wichtigen Veränderungen der intestinalen Umwelt führen.

Darmbakterien metabolisieren Nahrungsbestandteile und stellen daraus für den Wirt nützliche, aber auch schädliche Produkte her. So werden von der Clostridiumfamilie vorzugsweise Butyrat und andere kurzkettige Fettsäuren synthetisiert. Diese machen ca. 10 % der menschlichen Energiequellen im Darm aus und unterstützen das Epithelwachstum (Sartor 2008). Eine veränderte Zusammenstellung der mikrobiellen Flora kann somit zu einem veränderten Fettsäuregehalt führen.

Die kommensalen und nicht-pathogenen Bakterien werden normalerweise toleriert und lösen keine Entzündungsreaktionen aus. Eine Störung der immunologischen Balance könnte jedoch eine Überreaktion gegenüber normalen fäkalen Komponenten und schließlich zu einer chronischen Entzündung bei prädisponierten Individuen führen. Ein Verlust dieser Toleranz könnte beispielsweise durch eine defekte Mukosabarriere entstehen, was eine Adhäsion der Kommensalen an die Epithelzellen und Invasion in die Zellen begünstigt (Ohland und MacNaughton 2010, Fava und Danese 2011). Diese Barrieredefekte zeigen sich bei MC durch Veränderungen der lokalen Expression von Defensinen und anderen AMPs; bei CU durch Veränderungen der intestinalen Mukusschicht. Beides kann zu einer Schwächung der Mukosabarriere führen (Wehkamp, et al. 2008 und 2009, Gersemann, et al. 2011).

1.4.4 Defekte der intestinalen Mukosabarriere

Normalerweise ist der gesunde Darm kontinuierlich mit Mukus bedeckt. Als schützende Hülle fungiert der Mukus dabei als erste Verteidigungslinie gegen mechanische Verletzungen des Epithels, Schädigung durch Magensäure und Verdauungsenzyme sowie bakteriellen Toxinen und Enzymen. Spezifische Veränderungen in Struktur, Dicke und Kontinuität können die Schutzfunktion jedoch beeinträchtigen. So konnten in der Literatur qualitative und quantitative Modifikationen des Mukus mit der Pathogenese von CED, beispielsweise durch eine begünstigte bakterielle Invasion, in Zusammenhang gebracht werden. Die Arbeitsgruppe Pullan et al. zeigte bereits 1994, dass die Mukusschicht von CU-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen dünner und diskontinuierlich aufgebaut ist. Akut entzündete Bereiche sind überdies mukusfrei. Dagegen ist die Dicke der Mukusschicht bei MC-Patienten mit jener von gesunden Personen vergleichbar oder sogar dicker (Pullan, et

al. 1994). Fraglich ist jedoch, ob diese Veränderungen primär vorliegen oder sekundär durch die Krankheit hervorgerufen werden. Die dünnere Mukusschicht bei CU könnte durch eine defekte Gobletzellendifferenzierung zu erklären sein. Die Gobletzellen produzieren Mucine, aus denen die Mukusschicht zusammengesetzt ist. Untersuchungen zeigten, dass die Zahl der heranreifenden Gobletzellen, lokalisiert im oberen Bereich der Krypte, bei CU-Patienten mit einer Entzündung im Vergleich zu Kontrollen verringert ist. Gleiches gilt für die Mucinsynthese, die ebenfalls verringert ist (Gersemann, et al. 2009). Die produzierten Defensine werden somit nicht in der inneren Mukusschicht zurückgehalten, was es den Bakterien erlaubt in das Epithel zu gelangen und Entzündungen auszulösen.

Beim MC mit Lokalisation im Ileum sind vor allem die Panethzellen und die von ihnen synthetisierten α -Defensine HD5 und HD6 von großer Bedeutung (Jäger, et al. 2010). So konnte eine verminderte Expression dieser Defensine bei MC-Patienten festgestellt werden, wobei die weiteren Panethzellprodukte Lysozym und sPLA2 nicht reduziert vorlagen. Auffällig war vor allem die α -Defensinreduktion bei Patienten mit einer SNP13-Mutation im NOD2-Gen, die unabhängig vom Grad der Entzündung vorlag (Wehkamp, et al. 2005). Elphick et al. zeigten außerdem, dass die Langlebigkeit von HD5 in einem Komplex mit Trypsin und anderen Proteasen *in vivo* zu einer geminderten intraluminalen Funktion dieses antimikrobiellen Peptids führt. Gleichzeitig kommt es zu einem verstärkten Kontakt der intestinalen Mukosa zu luminalen Mikroorganismen und anderen Produkten (Elphick, et al. 2008). Auch Störungen in der Panethzellendifferenzierung können die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden beeinträchtigen. Dabei ist der Transkriptionsfaktor TCF4 (*T-cell factor 4*; TCF7L2; *transcription factor 7-like 2*), im für die Differenzierung der Panethzelle essentiellen Wnt-Signalweg, von besonderer Bedeutung. So konnte bei MC-Patienten eine verminderte mRNA-Expression dieses Faktors festgestellt werden, was einen negativen Einfluss auf die Panethzellendifferenzierung und die HD5- und HD6-Expression hat (Wehkamp, et al. 2007). In einer späteren Studie zeigte sich, dass genetische Variationen der TCF4-Promotorregion spezifisch mit MC des Ileums assoziiert sind (Koslowski, et al. 2010). Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine verringerte α -Defensinexpression zu einem erhöhten CED-Risiko führt. GWASs zeigten weitere

Suszeptibilitätsloci, die die Panethzellphysiologie und Defensine mit MC in Verbindung bringen. Eines dieser Proteine ist ATG16L1 (Autophagy-related protein 16-1), das zuerst von der Arbeitsgruppe Hampe et al. identifiziert wurde (Hampe, et al. 2007). ATG16L1 ist an der Autophagie und der korrekten Zersetzung von phagozytierten bakteriellen Strukturen beteiligt. Interessanterweise zeigen ATG16L1-Knockout-Mäuse eine veränderte Granula-Exozytose in den Panethzellen, was zu einer Verringerung der AMPs in der Mukosabarriere und einem verschlechterten antibakteriellen Effekt führt (Cadwell, et al. 2008). In einer Metaanalyse von Cheng et al., bei der 25 Studien betrachtet wurden, konnte ein spezieller Polymorphismus (T300A) mit einer erhöhten Suszeptibilität für CED korreliert werden (Cheng, et al. 2010).

Verglichen mit dem Dünndarm ist die normale α -Defensinexpression im Kolon sehr gering. Dort spielen vor allem die β -Defensine eine große Rolle. So ist es auch wenig verwunderlich, dass MC mit Lokalisation im Kolon mit einer gestörten β -Defensinexpression assoziiert ist. HBD1 war das erste Defensin, das im menschlichen Kolon identifiziert wurde und ist dort bis heute das einzige konstitutiv exprimierte Defensin. Kodiert wird HBD1 durch das *DEFB1*-Gen, dessen Expression wiederum durch den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ (PPAR γ) reguliert wird. Ein Mangel an PPAR γ in der intestinalen Mukosa führt bei Mäusen zu einer Reduktion der Expression von *mDefb10*, das mit *DEFB1* im Menschen identisch ist, und zu einer verringerten Aktivität gegenüber intestinalen Mikroorganismen wie *C. albicans*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* und *E. coli*. So konnte bei MC-Patienten in makroskopisch nicht-entzündeten Bereichen eine verminderte HBD1-Expression nachgewiesen werden (Peyrin-Biroulet, et al. 2010). Die antimikrobielle Aktivität von HBD1 kann durch die Reduktion der drei implizierten Disulfidbrücken gesteigert werden (Schroeder, et al. 2011). Thioredoxin unterstützt als Mediator die Reduktion von HBD1 im intestinalen Epithel. Sehr hohe Thioredoxinexpressionen wurden unter Entzündungsbedingungen dokumentiert, beispielsweise bei Tumoren und rheumatoider Arthritis (Maurice, et al. 1999). Eine Abnahme der Thioredoxinexpression konnte in Entzündungen bei MC nachgewiesen werden. Aufgrund einer verringer-

ten antimikrobiellen HBD1-Aktivität scheint diese Reduktion die Abwehrmechanismen gegen die Darmbakterien abzuschwächen (Schroeder, et al. 2011).

Im Gegensatz zum konstitutiv exprimierten HBD1 wird die Expression der restlichen β -Defensine (HBD2, -3 und -4) durch externe Stimuli induziert. Verschiedene Bakterientypen und proinflammatorische Zytokine sind in der Lage die Produktion von β -Defensinen zu fördern. So führt z.B. *E. coli* Nissle 1917 (ein probiotischer Bakterienstamm für die Behandlung von CU) zu einer erhöhten HBD2-Produktion (Wehkamp, et al. 2004). Im Vergleich dazu ist die HBD2-Expression im Kolon bei MC-Patienten deutlich schwächer (Fahlgren, et al. 2003, Wehkamp, et al. 2002 und 2003). Auch die beiden β -Defensine HBD3 und -4 scheinen demselben Expressionsmuster zu folgen (Fahlgren, et al. 2004). Verantwortlich für das Phänomen der pathologisch niedrigen AMP-Expression bei MC-Patienten könnte eine verminderte Genkopienzahl im β -Defensin-Lokus auf Chromosom 8p23.1 sein. Bei gesunden Menschen ist die DNA-Kopienzahl dieses Clusters weitestgehend polymorph (Hollox, et al. 2003). Fellermann et al. konnten bei Patienten mit MC im Kolon nur drei HBD2-Genkopien identifizieren, allerdings vier bei der Kontrollgruppe (Patienten mit MC im Ileum und CU-Patienten). Zusätzlich zeigten diese Patienten noch eine geringere HBD2-mRNA-Expression (Fellermann, et al. 2006). Dies konnte anhand einer neuseeländischen Patientenkohorte nicht untermauert werden (Bentley, et al. 2010). Auch das Cathelicidin LL37 und die antimikrobiell wirksamen Serinproteaseinhibitoren Elafin und SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor) werden bei MC-Patienten im Vergleich zu CU-Patienten vermindert induziert (Schauber, et al. 2006, Schmid, et al. 2007). Demgegenüber werden die β -Defensine bei CU-Patienten hinreichend induziert. Auch die antimikrobielle Aktivität ist verglichen mit entzündeter MC-Mukosa bei entzündeter CU signifikant erhöht. Die ca. 300- bis 1000-fach erhöhte Expression von HBD2, -3 und anderen AMPs während der Entzündung lassen auf eine intakte Mukusbarriere schließen. Es scheint also, dass die Defensinsynthese und die antimikrobielle Aktivität bei CU nicht gestört sind. Zudem zeigten Biopsieextrakte von CU-Patienten gegen diverse Bakterien eine gesteigerte Aktivität (Nuding, et al. 2007, Schmid, et al. 2007).

Viele der bereits veröffentlichten Daten legen nahe, dass bei CED die antimikrobielle Schutzbarriere eine zentrale Rolle spielt. Es bleiben jedoch viele Fragen offen. Fest steht aber: Eine verminderte Expression antimikrobiell wirksamer Peptide kann in einer geschwächten Mukosabarriere resultieren.

1.5 Zielsetzung

Histone bilden die fundamentale Organisationseinheit der eukaryotischen Chromosomen. Sie sind für die Verpackung der DNA verantwortlich und Ort posttranslativeller Modifikation. Neben diesen elementaren Aufgaben zeigen extrazelluläre Histone starke antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Kernhistone systematisch analysiert und aus humanem Kolongewebe isoliert sowie ihre Rolle bei CED und ihre antimikrobielle Aktivität gegen ausgewählte Mikroorganismen näher untersucht.

In vorangegangenen Analysen konnte bereits eine verminderte Expression der klassischen AMPs wie HBD3 und LL37 bei Patienten mit MC nachgewiesen werden. Im ersten Teil wurden deshalb Transkriptom und Translatom der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 aus humanen Kolonbiopsien von gesunden Kontrollen und Patienten mit CED untersucht und miteinander verglichen. Ziel war es auch bei Histonen mögliche Unterschiede zwischen CED-Patienten und gesunden Kontrollen in der mRNA sowie im translatierten Protein nachzuweisen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Fokus auf isolierte Histone aus humanem Kolongewebe gelegt. Überprüft wurde die korrekte Histonextraktion durch Fraktionierung per RP-HPLC und Massenanalyse mit MALDI-TOF-MS. Die antimikrobielle Aktivität der extrahierten Histone wurde anschließend durchflusszytometrisch gegen verschiedene Mikroorganismen untersucht. Veränderungen ihrer Aktivität könnten als weiterer pathologischer Defekt bei CED gewertet werden. Weiterhin wurden das Vorkommen und die Lage extrazellulärer Histone im Kolon durch histologische Färbungen veranschaulicht. Aufgrund der starken Desquamation von Darmepithelzellen bei CED-Patienten ist eine Anlagerung der Histone im Mukus zu vermuten.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der antimikrobiellen Aktivität der Histone und deren Wechselwirkung untereinander sowie mit anderen AMPs. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Vitalitätstests wurde die stammspezifische Steigerung der Histonaktivität untersucht. Von besonderer Bedeutung sind die synergistischen Effekte, anhand derer man die Rolle der Histone im Darmepithelbereich darlegen kann. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde die antimikrobielle Aktivität der Histone zusätzlich visualisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Firma
Acetonitril, ROTISOLV® HPLC	Roth, Karlsruhe
Agarose LE <i>low electroendosmosis</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Albumin, bovine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampuwa®, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Antibody Diluent, Dako Real	Dako, Hamburg
BBL™ Schaedler Broth, Vitamin K ₁	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
BD FACS Clean™	Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien
BD FACS Flow™	Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien
BD FACS-Rinse™	Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien
Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, München
Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, DiBAC ₄ (3)	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut	VWR International GmbH, Darmstadt
Coomassie® Brilliantblau R 250	Merck, Darmstadt
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako, Hamburg
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution	Dako, Hamburg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DL-Dithiothreitol Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA Ladder (100 BP, 1 KBP)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Dye-Reagent-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories, München
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid (CH ₅ N ₃ -HCl)	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Harnstoff (Urea)	PROMEGA GmbH, Mannheim
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	PeptaNova, Sandhausen
Macro-Prep® CM Support (Beads)	Bio-Rad Laboratories, München

Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Qiagen, Hilden
Methanol, ≥ 99,9 % (zur Synthese)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl, for analysis)	Merck, Darmstadt
Neoclear	Merck, Darmstadt
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels, 12 %	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pepstatin A	PeptaNova, Sandhausen
Peroxidase-Blocking Solution, Dako Real	Dako, Hamburg
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Propanol (zur Synthese)	Roth, Karlsruhe
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
Salzsäure (Hydrogenchlorid, HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
SeeBlue® Plus 2 Pre-stained Standard	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin-PE	Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien
Target Retrieval Solution (10x), pH 6	Dako, Hamburg
Target Retrieval Solution (10x), pH 9	Dako, Hamburg
TRIS, Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Roth, Karlsruhe
TRIzol® Reagent	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Tween-20	Merck, Darmstadt
X-Gal, 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (C ₁₄ H ₁₅ BrClNO ₆)	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste aller Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
Adhäsionsobjektträger, Superfrost® Plus	VWR, Darmstadt
AnaeroGen™	Oxoid, Wesel
Biopsiestanzen (steril, 3 mm)	Pmf, Köln
Deckgläser	VWR, Darmstadt
Einmal-Impfösen (1 µl, 10 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Einwegspritzen mit Luer-Anschluss (10 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
FACS-Röhrchen (12 x 75 mm)	Multimed Biotechnologiekontor GmbH, Giengen
Falcons (12 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
HPLC-Vials (2 ml, silikonisiert)	Glastechnik Gräfenroda, Gräfenroda
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nürnberg

LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikrotomklingen A-35	Feather, Osaka, Japan
Nitrocellulosemembran	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsstreifen (0,2 ml)	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalenspatel Delta (172 x 37 x 4 mm)	Roth, Karlsruhe
Pipetten, steril, non-pyrogenic (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitzen (ep T.I.P.S. Reload Eppendorf Tips, verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg
Pistill	Roth, Karlsruhe
Protran BA83 Nitrocellulosemembran (0,2 µm, 20 mm x 3 m)	Whatman, Dassel
Safe-Lock Tubes (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Spritzenvorsatzfilter Puradisc™ FP 30 CA	VWR International GmbH, Darmstadt
Universal-Indikatorpapier	Macherey-Nagel, Düren
Whatman-Filterpapier	Whatman, Dassel

2.1.3 Geräte

Tabelle 4: Liste aller verwendeten Geräte

Gerät	Firma
ABI 3500 Dx Genetic Analyzer	Hitachi, Japan
Agilent 1200 Series System (HPLC)	Agilent Technologies, Waldbronn
Anaerobiertopf	Oxoid, Wessel
Analysewaage XS 105 DualRange Excellence	Mettler Toledo, Gießen
Autoklav (SX-Serie)	TOMY Digital Biology, Japan
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
CCD-Kamera Las1000	Fujifilm, Düsseldorf
Dampfgarer (FS20)	Braun, Kronberg
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine	Ziegra-Eismaschinen, Isernhagen
Electrophoresis Power Supply EV 231	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Forschungsmikroskop Laborlux S mit Leica Wild MPS52-Kamera	Leica/Leitz, Wetzlar
Heizblock DB-2A	Techne, Duxford, United Kingdom
Laborschüttler Modell 3014	GFL, Burgwedel
Lightcycler 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lightcycler 2.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MALDI-TOF-MS (Ultraflex Tof/Tof)	Bruker Daltonik, Bremen
Mikrotom RM2055	Leica Microsystems, Wetzlar
NanoDrop 2000 Spektrometer	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
Reinstwasser-Anlage	Millipore, Schwalbach/Ts.

Rotations-Vakuum-Konzentrator (RVC 2-25 CD plus)	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode
Stickstofftank (Biosafe-Control® β) T 10 basic, ULTRA-TURRAX®	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen/Sieg IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Thermocycler (PTc-0200 DNA Engine Version 4.0)	MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Variomag Electronicrührer Monotherm	Thermo Electron, Oberschleißheim
Victor™ 1420 Multilabel Counter	Wallac (PerkinElmer), Waltham, MA, USA
Vortexer, Heidolph Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage XS4002S Delta Range®	Mettler Toledo, Gießen
XCell SureLock™ Mini Cell Electrophoresis System	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

2.1.4 Kits

Tabelle 5: Liste aller verwendeten Kits

Kit	Firma
Agilent RNA 6000 Nano Kit (#5067-1511)	Agilent Technologies, Waldbronn
AMV Reverse Transcriptase	PROMEGA GmbH, Mannheim
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (#4337450)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako, Hamburg
Epi Seeker Histone Extraction Kit (#ab113476)	Abcam, Cambridge, United Kingdom
HotStar Taq Mastermix Kit (# 203443)	QIAGEN, Hilden
Human Histone H2A type 2-C (HISTH2AC) ELISA Kit (# CSB-EL010445HU)	Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln
Human Histone H2B ELISA (# E01H0244)	Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (#04707516001)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (# 12239264001)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit (# 27104)	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit (# 28104)	QIAGEN, Hilden
Ridascreen® <i>Clostridium difficile</i> Toxin A/B Enzymimmunoassay Kit (# C0801)	R-Biopharm, Darmstadt
RNase-Free DNase Set (#79254)	QIAGEN, Hilden
RNEasy Mini Elute Clean up Kit (#74204)	QIAGEN, Hilden
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce Protein Biology Products/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, mit chemisch kompetenten <i>E. coli</i> (#K4500-J10)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.1.5 Rekombinante Peptide

Tabelle 6: Liste aller verwendeten rekombinanten Peptide

Peptid	Firma
Beta-Actin (human, #ab13772)	Abcam, Cambridge, UK
Beta-Defensin-3 (human, #4382-S)	PeptaNova, Sandhausen
Histone H2A (human, #M2502S)	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt a.M.
Histone H2A (human, #15-0301)	EpiCypher™ Inc, Chapel Hill, North Carolina, USA
Histone H2B (human, #M2505S)	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt a.M.
Histone H2B (human, #15-0302)	EpiCypher™ Inc, Chapel Hill, North Carolina, USA
Histone H3.3 (human, #M2507S)	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt a.M.
Histone H4 (human, #M2504S)	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt a.M.
Histone Octamer full length (human, #SRP0408)	Sigma-Aldrich, Steinheim
LL-37 (human, #SP-LL37-1)	Innovagen, Lund, Schweden

2.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Liste aller verwendeten Antikörper

Antikörper	Firma
Anti-Acetyl-Histone-H2A (polyclonal, produced in rabbit, #3653-100)	BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA
Anti-Beta-Actin (polyclonal, produced in rabbit, #ab8227)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Histone-H2A (polyclonal, produced in rabbit, #3621-100)	BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA
Anti-Histone-H2A (BIOTIN) (polyclonal, produced in rabbit, Biotin-conjugated, #ABIN703993)	Antibody-Online GmbH, Aachen
Anti-Histone-H2B (polyclonal, produced in rabbit, #ab18977)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Histone H2B (FITC) (polyclonal, produced in rabbit, FITC-conjugated, #ABIN1957019)	Antibody-Online GmbH, Aachen
Anti-Histone-H3 (polyclonal, produced in rabbit, #3623-100)	BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA
Anti-Histone-H4 (polyclonal, produced in rabbit, #3624-100)	BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA
Anti-Histone-H4 (polyclonal, produced in rabbit, #orb6171)	Biorbyt Ltd., Cambridge, UK

Sekundärantikörper Goat-Anti-Mouse (Peroxidase-conjugated AffiniPure IgG (H+L), #115-035-003)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, Suffolk, England
Sekundärantikörper Goat-Anti-Rabbit (Peroxidase-conjugated AffiniPure IgG (H+L), #111-035-003)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, Suffolk, England

2.1.7 Mikroorganismen

Tabelle 8: Liste aller Mikroorganismen

Stamm	Bezugsquelle
<i>Bacteroides fragilis</i> PZ4046	Ardeypharm GmbH, Herdecke
<i>Bacteroides fragilis</i> Patientenisolat 288	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	American Type Culture Collection
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> Ni 3, 29c	Klinisches Isolat aus Fäzes (human, Kind mit Darmflora-Störung), Ardeypharm GmbH, Herdecke
<i>Candida albicans</i> Patientenisolat 526	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Candida albicans</i> Patientenisolat 248	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Candida albicans</i> Patientenisolat 526	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> 003	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> Patientenisolat 1856	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> Patientenisolat 3331	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> Patientenisolat 5071	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> Patientenisolat 5397	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> Patientenisolat 5684	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> Patientenisolat 6504	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> Patientenisolat 7208	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Clostridium difficile</i> Patientenisolat 9810	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	American Type Culture Collection
<i>Escherichia coli</i> K12	DMSZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> Patientenisolat 395	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Escherichia coli</i> Patientenisolat 868	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	American Type Culture Collection
<i>Staphylococcus aureus</i> Patientenisolat 375	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen
<i>Staphylococcus aureus</i> Patientenisolat 875	Klinisches Isolat, Alb Fils Kliniken, Göppingen

Versuche mit pathogenen Erregern wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin der Alb Fils Kliniken in Göppingen durchgeführt.

2.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 9: Liste aller in dieser Studie verwendeten Oligonukleotide

Name	Schmelztemperatur, T _m [°C]	Basen	GC-Gehalt [%]	Sequenz (5' → 3')
H2AF3	57	19	52,6	TCGGGACAACAAGAAGACG
H2AR3	58	20	50	TCTTTGGTAACAGAACGGCC
H2BF5	60	20	55	TAAGTCTGCTCCAGCCCCTA
H2BR5	56	20	45	AGATGTCGTTGACGAAGGAA
H3.3F	60	20	55	CGCTTCGAGAGATTCGTCGT
H3.3R	60	20	55	GGACGAGAGCCGCACTATTA
H4/2F	60	20	55	TGTGGCGCGTAGTCTTACTG
H4/2R	58	20	50	CAGGTGATCTGGCCTTTCAT

2.2 Methoden

2.2.1 Biologisches Material

In dieser Arbeit wurden verschiedene Gewebe und Sekrete verwendet: humane Biopsien, humane Resektate aus Kolongewebe sowie humane Mukusabstriche. Die Kolonresektate von Patienten mit Kolonkarzinom sowie während einer medizinisch indizierten Endoskopie entnommenen Kolonbiopsien und Mukusabstriche wurden von der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart zur Verfügung gestellt. Ein Ethikvotum der Universität Tübingen lag vor. Jeder Patient wurde im Voraus ausführlich aufgeklärt und hat sich schriftlich zur Teilnahme an der Studie bereit erklärt.

2.2.2 Aufarbeitung der Proben

2.2.2.1 Aufarbeitung mit Essigsäure für antimikrobielle Aktivität

Die Kolonbiopsien wurden auf flüssigem Stickstoff mit einem Pistill gemörsert und nach Abdampfen des Stickstoffs in 60 µl 5 %iger Essigsäure aufgenommen. Anschließend wurde ein Proteinase-Inhibitorcocktail (PIC) bestehend aus 1 µl PMSF (1 mM), 1 µl Pepstatin (1 mg/ml) und 1 µl Leupeptin (1 mg/ml) hinzugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurde die Probe für zwei Stunden auf Eis und bei 4 °C inkubiert. Dabei wurde gelegentlich gevortext. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe bei 2000 g für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, der Überstand abge-

nommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet wurde verworfen. 5 µl dieser Gesamt-Proteinsuspension wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung (P1) separiert. Der restliche Überstand wurde in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert; das Pellet danach in 50 µl 0,01 %iger Essigsäure mit PIC aufgenommen.

Um die kationischen und anionischen Peptide und Proteine voneinander zu trennen wurde Macro-Prep® CM Support („Beads“) eingesetzt. Diese mussten vor jedem Gebrauch vorbereitet werden: Etwas mehr als das benötigte Volumen wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Sobald sich der Feststoff am Boden abgesetzt hatte wurde der Überstand (Ethanol) abpipettiert und das gleiche Volumen mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 aufgefüllt. Die Mischung wurde 10 min bei RT vorsichtig geschüttelt. Nach Absetzen des Feststoffs wurde der Überstand abpipettiert und das gleiche Volumen Phosphatpuffer hinzugegeben. Die Mischung wurde anschließend nochmals gewaschen und am Ende in Phosphatpuffer aufgenommen.

Zu 50 µl Probe wurden 2 µl Beads gegeben und über Nacht bei 4 °C vorsichtig geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte ein Waschen mit 20 µl Ammoniumacetat. Nach 10 min Schütteln bei RT und Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und 5 µl der kationischen Proteinsuspension für die Proteinkonzentrationsbestimmung (P2) entnommen. Der restliche Überstand wurde bei -20 °C gelagert. Die im Pellet enthaltenen Beads wurden zweimal mit je 20 µl 5 %iger Essigsäure eluiert, um die anionischen Proteine herauszulösen. Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert und anschließend in 50 µl 0,01 %iger Essigsäure aufgenommen. Auch von der anionischen Proteinsuspension wurden 5 µl zur Konzentrationsbestimmung (P3) entnommen und der Rest bei -20 °C gelagert.

Tabelle 10: Anleitung 0,1 M Phosphatpuffer

Chemikalie/Reagenz	
0,1 M K ₂ HPO ₄ (250 ml)	} 50 ml KH ₂ PO ₄ vorlegen und mit K ₂ HPO ₄ auf pH 7,4 titrieren
0,1 M KH ₂ PO ₄ (50 ml)	

2.2.2.2 Aufarbeitung mit TRIzol Reagent

Von jedem Patienten wurde eine zweite Biopsie mit TRIzol Reagent aufgearbeitet. Hierfür wurden die Biopsien auf flüssigem Stickstoff mit einem Pistill gemörsert und

in 1 ml TRIzol-Reagent aufgenommen. Anschließend wurde so lange gevortext, bis keine Gewebestücke mehr zu erkennen waren. Es folgte eine Inkubation bei RT von 10 min. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Reaktionsgefäße 1 min von Hand geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Mit Hilfe einer Zentrifugation bei 11600 rpm von 15 min kommt es zu einer Auftrennung der Probe in drei Phasen: Die wässrige Phase enthält die RNA, die graue Phase DNA und die rosa Phase die Proteine. Vorsichtig wurde die obere Phase (RNA) abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Aufarbeitung der RNA und der Proteine erfolgte getrennt voneinander.

Zur RNA-Phase wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben, die Reaktionsgefäße kurz geschüttelt, 10 min bei RT inkubiert und bei 11600 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, mit 1000 µl 75 %igem Ethanol gewaschen und kurz gevortext. Es folgte eine Zentrifugation der RNA bei 7600 rpm für 5 min. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet ca. 15 min bei RT getrocknet. Zum Schluss wurde das RNA-Pellet mit 25 µl DEPC-Wasser im Thermomixer bei 55 °C für 10 min resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur DNA- bzw. Proteinphase wurden 300 µl 100 %iges Ethanol gegeben und 3 min bei RT inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurde daraufhin 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, also die Phenol-Ethanol-Phase mit dem enthaltenen Protein, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dem 1500 µl Isopropanol hinzugegeben wurden. Das Ganze wurde 10 min bei RT inkubiert und bei 12000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde nicht verwendet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet dreimal mit 2 ml Guanidin-Hydrochlorid (0,3 M in 95 %igem Ethanol) gewaschen: Hierfür wurde das Guanidin-Hydrochlorid zum Proteinpellet gegeben, kurz gevortext, 30 min bei RT inkubiert und bei 7600 rpm 5 min zentrifugiert. Nach dem dritten Waschschrift wurden 2 ml 100 %iges Ethanol hinzugegeben, die Proben kurz gevortext, 20 min bei RT inkubiert und 5 min bei 7600 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet werden. Das Pellet wurde schließlich in 25 µl Harnstoff/DTT-Lösung (10 M/50 mM) resuspendiert und

1 h bei RT inkubiert und danach 3 min bei 94 °C im Heizblock denaturiert. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentrationen der Proben zu bestimmen, wurde die so genannte Bradford-Methode angewandt (Bradford 1976). Hierbei wird der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 verwendet, der im Falle einer Proteinbindung sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zu Beginn der Untersuchung wurde eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt. Dabei wurde die benötigte BSA-Menge (Stammlösung 1 mg/ml) mit destilliertem Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 800 µl aufgefüllt. 1, 2 bzw. 5 µl jeder Probe wurden ebenfalls auf dieses Reaktionsvolumen ergänzt. Nach Zugabe von 200 µl Dye-Reagent-Konzentrat und kräftigem Mischen erfolgte eine Inkubation bei RT von 5 min. Anschließend konnte die Extinktion bei 595 nm mit einem Photometer gemessen und die Konzentration mit Hilfe der Standardreihe berechnet werden.

Tabelle 11: Pipettierschema der BSA-Standardreihe nach Bradford

Standard	BSA-Stammlösung [µl]	Bidest. H ₂ O [µl]	Dye-Reagent- Konzentrat [µl]
S0	0	800	200
S1	1	799	200
S2	2	798	200
S3	3	797	200
S4	4	796	200
S5	6	794	200
S6	8	792	200
S7	10	790	200
S8	12	788	200

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur spezifischen Amplifizierung bestimmter Gensequenzen (Saiki, et al. 1988). Dabei wird die gewünschte DNA-Sequenz unter anderem unter Verwendung der thermostabilen Taq-Polymerase und sequenzspezifischer Primer exponentiell vervielfältigt. In der folgenden Tabelle sind ein Reaktionsansatz und ein Programmbeispiel für eine Standard-PCR dargestellt. Das Programm wurde je nach Ansatz (Probe, Fragmentlänge, Primer) entsprechend modifiziert.

Tabelle 12: Reaktionsansatz und Programmbeispiel einer Standard-PCR

Reaktionsansatz:		Programmbeispiel:		
Komponente	Volumen [μ l]	Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
Probe (cDNA)	4	1 Denaturierung	95	15
Bidest. H ₂ O	9	2 Denaturierung	94	1
Q-Solution	5	3 Annealing	50-60*	1
PCR-Puffer (10 x)	2,5	4 Elongation	72	1*
dNTPs	1,25	5 Elongation	72	10
MgCl ₂	1	6 Final	12	∞
Hot Star Taq	0,25	* Die Annealingtemperatur hängt von der jeweiligen Primerschmelztemperatur (T_m-5° C) ab; die Elongationszeit von der Produktgröße. Diese beiden Werte müssen dementsprechend angepasst werden.		
Primer F/R	1/1			
Total Σ	25			

2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der Nukleinsäuren (RNA und DNA) erfolgte mit Elektrophorese auf Agarosegelen. Hierbei werden die Nukleinstränge aufgrund ihrer negativen Ladung zum Pluspol gezogen und innerhalb des Agarosegels nach ihrer Größe aufgetrennt. Zum Nachweis der Nukleinsäuren wurde Ethidiumbromid verwendet, das in Nukleinsäuren interkaliert und dabei sein Absorptionsspektrum verändert. Es wird so unter UV-Licht im sichtbaren Bereich von 560 nm fluoresziert. Dabei ist die Lichtintensität des Ethidiumbromids proportional zur vorhandenen DNA- und RNA-Konzentration sowie zur Länge der Nukleinsäuren (Browning, et al. 1938, Waring 1965). Für das 1,2 %ige Agarosegel wurde 1,2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgeköcht. Sobald die Masse

auf etwa 50 bis 60 °C abgekühlt war, wurden zwei Tropfen 1 %ige Ethidiumbromid-lösung hinzugegeben. Es wurde kurz geschwenkt und der Inhalt in eine vorbereitete Gelkammer gefüllt. Als Platzhalter für die Probenaschen diente ein Kamm. Nach dem Auskühlen und gleichzeitigem Erstarren des Agarosegels wurde die Elektrophoresekammer mit 1 × TAE-Puffer gefüllt, das Gel darin platziert und die Proben zusammen mit 4 µl Bromphenolblau (Ladungspuffer) in die Probenaschen pipetiert. Nach 1 h bei 100 V konnte das Gel unter UV-Licht entwickelt werden.

Tabelle 13: Anleitung 50 × TAE-Puffer

Chemikalie/Reagenz	Menge/Volumen	
TRIS (2 M)	242 g	} Auf pH 8,3 einstellen
Reine Essigsäure (1 M)	57,1 ml	
EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml	
Destilliertes Wasser (bidest. H ₂ O)	ad 1000 ml	

2.2.3.3 Quantifizierung der RNA und Beurteilung der Qualität

Die Konzentration der isolierten RNA (siehe Kapitel 2.2.2.2) wurde mithilfe eines UV/VIS-Spektrometers dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf der Anregung von Valenzelektronen mit ultraviolettem und sichtbarem Licht (UV/VIS). Die Konzentration von Nukleinsäuren (RNA und DNA) wird bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei dies einer Absorptionseinheit A_{260} von 40 µg/µl entspricht. Um ein Maß der Verunreinigung der RNA zu erhalten wurde außerdem die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der Quotient $A_{260/280}$ sollte sich im Bereich von 1,7 bis 2,1 bewegen.

Die Qualität der RNA wurde anschließend mit dem RNA 6000 Nano Kit von Agilent bestimmt. Hierbei werden so genannten *RNA Integrity Numbers* (RINs) erstellt, denen ein komplizierter Algorithmus zugrunde liegt und hauptsächlich die Degradation der vorliegenden RNA einbezieht. Die Integrität wird auf einer Skala von 0 bis 10 angegeben, wobei niedrige Werte mit hoher Degradation korrelieren und umgekehrt. In dieser Arbeit wurden nur RNA-Proben mit einem sehr hohen RIN-Wert (> 8) verwendet (Schroeder, et al. 2006).

2.2.3.4 cDNA-Synthese

Ausgehend von der jeweiligen RNA wird durch das Enzym Reverse Transkriptase die komplementäre cDNA im Zuge einer Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) synthetisiert. mRNA-Moleküle sind an ihrem 3'-Ende polyadenyliert, so kann einerseits als Primer ein Oligo-dT-Nukleotid (15 bis 25 Desoxythymidine) oder andererseits ein Random Hexamer Primer (6 zufällige Nukleotide) verwendet werden, die beide in der Lage sind komplementär an den Poly-A-Schwanz der mRNA zu binden und so als Startpunkt für die Polymerase dienen.

In dieser Arbeit wurde das AMV-Reverse Transcription System Kit (Promega) verwendet. 500 ng RNA wurden zusammen mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10,625 μl gebracht (10,625 μl H₂O - RNA-Volumen) und im Thermocycler 10 min bei 70 °C vorbehandelt, um die RNA zu denaturieren. Währenddessen wurde nach Tabelle 14 der Mastermix pipettiert. Dabei mussten alle Schritte auf Eis durchgeführt werden. RNAsin und AMV-RT durften erst zum Schluss aus dem Gefrierschrank geholt werden. Die Proben wurden nach Ende der Zeit aus dem Thermocycler genommen, kurz herunterzentrifugiert und 9,375 μl Mastermix zu jedem Ansatz pipettiert. Anschließend wurde im Thermocycler amplifiziert: Zuerst 15 min bei 42 °C, dann 5 min bei 95 °C. Nach Ende der Amplifikation wurden die Proben 5 min auf Eis gestellt und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 50 μl aufgefüllt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 14: Anleitung Mastermix (1 x) cDNA-Synthese bei 500 ng RNA

Chemikalien/Reagenzien	Volumen [μl]
RNA (500 ng)	X*
Nuklease-freies H ₂ O	10,625 - X*
MgCl ₂	4
Puffer	2
dNTP-Mix	2
Oligo	0,5
RNAsin	0,5
AMV-RT	0,375
Total Σ	20

* Probenabhängig

2.2.3.5 Klonieren der cDNA in *E. coli*

Die extrahierte cDNA ausgewählter Proben wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits nach Herstellerangaben in einen pCR2.1 TOPO Vektor ligiert und in kompetenten *E. coli*-Bakterien kloniert. Mit diesem Verfahren sollten Plasmide der Kernhistone gewonnen, deren Eigenschaften mittels Q-PCR (siehe Kapitel 2.2.3.6) untersucht und miteinander verglichen werden. Das Klonieren von Plasmiden ist in mehrere Schritte eingeteilt: Die Amplifizierung und Aufreinigung der PCR-Produkte, die Transformation dieser Produkte in kompetente *E. coli*-Bakterien, die Isolation der darin enthaltenen Plasmid-DNA und die anschließende Kontrollsequenzierung.

Zu Beginn muss von der gewünschten Gensequenz ein PCR-Produkt amplifiziert (siehe Kapitel 2.2.3.1) und mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.3.2) auf seine Richtigkeit überprüft werden. Die folgende Aufreinigung des PCR-Produktes wird mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. In der zweiten Phase wird das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Zuerst wurde eine Ligationsreaktion gestartet, in dem 1 µl Salzlösung zu 4 µl PCR-Produkt und 1 µl Vektor gegeben wurden. Dieser Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte die *One Shot*[®] *Chemical Transformation*, bei der 2 µl des Ligationsansatzes zu einem definierten Volumen kompetenter *E. coli*-Bakterien gegeben wurde. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation bei 42 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden anschließend, nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium, 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. In dieser Zeit wurden LB-Platten mit 50 µl Ampicillin-Lösung (50 mg/ml) und 40 µl X-Gal beimpft und bei RT getrocknet. Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf die Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten für 2 h im Kühlschrank gelagert, um eine vollständige Farbentwicklung zu gewährleisten. Von jeder Platte wurden 10 weiße Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 5 ml flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde das QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Die bewachsenen Übernachtskulturen wurde bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert (Hettich Universal 320R); die restlichen Schritte erfolgten nach Herstel-

lerangaben. Anschließend wurde die Plasmid-DNA-Konzentration am NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) bestimmt. Um den korrekten Einbau des Inserts in den Vektor zu bestätigen wurde je 500 ng der Plasmid-DNA mit 1 µl des Restriktionsenzym EcoRI und 4 µl NE-Puffer und Nuklease-freiem Wasser (Endvolumen 20 µl) geschnitten (Inkubation: 37 °C, 1 h) und anschließend mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Bei korrektem Einbau des PCR-Produktes waren nun auf dem Gel zwei Banden zu erkennen: Eine obere Bande bei 3,9 kb (= Vektor) und eine untere Bande auf Höhe der Sequenzlänge des jeweiligen PCR-Produktes.

In der letzten Phase wurde die korrekte Plasmid-DNA mit Hilfe dem Applied Biosystems™ 3500 Dx Series Genetic Analyzer (Hitachi, Life Technologies) und dem BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit 1.1 (Thermo Fisher Scientific) sequenziert. Die Durchführung der Sequenzier-PCR, der Ethanolfällung und der Sequenzanalyse erfolgte nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.6 Realtime-PCR (Q-PCR)

Die Q-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht aber mittels Fluoreszenzmessung zusätzlich die Quantifizierung der DNA in Echtzeit. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoffe wie Ethidiumbromid oder SYBR Green I verwendet, die in die DNA interkalieren, wodurch die Fluoreszenz dieses Stoffes ansteigt. Die Zunahme der Signalstärke korreliert dabei proportional mit der Produktmenge. Die quantitative Ausgangsmenge der DNA wird mit Hilfe des *crossing points* beschrieben, der Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz einer Probe das Hintergrundsignal deutlich überschreitet. Neben der Bestimmung der Quantität wird nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität der Probe bestimmt werden kann.

Die Analysen in dieser Arbeit wurden mit einem *fluorescence temperature cycler* (Lightcycler®, Roche Diagnostics) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionen wurden jeweils in 10 µl Ansätzen in speziellen Kapillaren (Roche Diagnostics) gefahren. Hierfür wurde auf Eis zu 9 µl des Mastermixes (siehe Tabelle 15)

1 µl Template-cDNA pipettiert, die Kapillaren kurz zentrifugiert und der Lauf gestartet.

Tabelle 15: Anleitung Mastermix (1 x) der Q-PCR

Chemikalien/Reagenzien	Volumen [µl]
Template-cDNA	1
Nuklease-freies H ₂ O	5,8
MgCl ₂ (3 mM)	1,2
Primer F/Primer R	0,5/0,5
Enzym Mix (1a + 1b)	1
Total Σ	10

Tabelle 16: Typisches Lightcycler-Programm

Analyse	Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
-	1	1 Initiale Denaturierung	95	10 min
Quantifizierung (PCR)	40	2 Denaturierung	95	15
		3 Annealing	*	30
		4 Elongation	72	*
		5 Denaturierung	95	0
Schmelzkurve	1	6 Annealing	65	15
		7 Melting	95	0,1 °C/s
		8 Kühlen	40	30

* Die Annealingtemperatur hängt von der jeweiligen Primerschmelztemperatur ($T_m - 5^\circ\text{C}$) ab; die Elongationszeit von der Produktgröße. Diese beiden Werte müssen dementsprechend angepasst werden.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Western Blot

Als Western Blot wird der Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran bezeichnet. Die Proteinsuspension wird zuvor gelelektrophoretisch in einzelne Proteinbanden aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper detektiert. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Konzentration aller Kernhistone (H2A, H2B, H3 und H4) in den Patientenbiopsien analysiert und miteinander verglichen. Ziel war es mögliche Unterschiede zwischen den gesunden und erkrankten Patienten auf Proteinebene zu ermitteln. Um alle Histone miteinander vergleichen zu können wurden bei jedem Blot und für jede Histonfamilie immer die gleiche Proteinmenge (6 bzw. 12 µg) eingesetzt. Ebenfalls wurde bei jedem Histon das entsprechende rekombinante Protein

in mehreren Konzentrationen mitaufgetragen, um anschließend mit Hilfe der entstehenden Standardgeraden die Konzentration des gesuchten Histons zu bestimmen.

Zunächst wurde zu 6 bzw. 12 µg Probe 3 µl Probenpuffer gegeben und mit bidest. Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Diese Mischung wurde im Heizblock bei 94 °C für 3 min denaturiert. Für die Gelelektrophorese wurde ein 12 %iges BIS-TRIS-Gel (NuPAGE® Novex von Invitrogen/Life Technologies) verwendet. In die erste Tasche wurden 5 µl des Probenmarkers SeeBlue® Plus2 (Invitrogen/Life Technologies) pipettiert; in die folgenden drei Taschen die unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen rekombinanten Histone und in die restlichen Taschen die denaturierten Proben. Als Laufpuffer wurde der NuPAGE® MES SDS Running Buffer 20 x (Invitrogen/Life Technologies) verwendet, der zuvor mit bidest. Wasser 20-fach verdünnt wurde. Bei 100 V erfolgte eine Elektrophorese für 90 min.

Anschließend wurden die Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurde für jedes Gel sechs Whatman-Filterpapiere (8 x 6 cm) sowie eine Nitrocellulosemembran zugeschnitten und kurze Zeit in Semi-dry Transferpuffer inkubiert. Drei Filterpapiere wurden daraufhin auf die Kathode der Fast-Blotapparatur gelegt, gefolgt von dem Gel, der Nitrocellulosemembran und drei weiteren Filterpapieren. Eventuell vorhandene Lufteinschlüsse wurden sorgfältig entfernt. Die Übertragung der Proteine erfolgte nach Auflegen der Anode bei 200 mA für 15 min (bei zwei parallel laufenden Blots muss eine Stromstärke von 400 mA angelegt werden). Nun erfolgte die Immundetektion: Der Blot wurde zunächst 1 h in einem Blockierungspuffer (5 % Magermilchpulver in TBST) inkubiert, um unspezifische Anlagerungen des Primärantikörpers zu verhindern. Die folgende Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (Verdünnungen siehe

Tabelle 18) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal 5 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen und danach 60 min mit dem jeweiligen Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschschriffe mit TBST und schließlich eine Inkubation (5 min) in SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Mit Hilfe der CCD-Kamera Las1000 (Fujifilm) konnten die Proteinbanden der Blots sichtbar gemacht werden.

Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit dem Graphikprogramm AIDA Image Analyzer Version 4.50. Dieses Programm korreliert die Intensität der Banden mit der Proteinkonzentration. Die aus den Banden gewonnenen Daten können dann als Zahlenwerte umgerechnet miteinander verglichen werden.

Tabelle 17: Anleitung Semi-Dry Transferpuffer und TBST-Waschpuffer

Semi-Dry Transferpuffer		TBS-Puffer (10 x)*	
Chemikalie/ Reagenz	Menge/ Volumen	Chemikalie/ Reagenz	Menge/ Volumen
TRIS-Base	29 g	Bidest. H ₂ O	800 ml
Glycin	14,6 g	TRIS (0,05 M)	6,05 g
20 % (w/v) SDS (in H ₂ O)	9,25 ml	NaCl (0,15 M)	8,76 g
Methanol	1000 ml	Bidest. H ₂ O	Ad 1000 ml
Bidest. H ₂ O	ad 5000 ml	* Für die Verwendung als TBST-Waschpuffer (1x) wurde der Puffer 10-fach mit bidest. H ₂ O verdünnt und 10 ml Tween 20 hinzugefügt.	

Tabelle 18: Antikörperverdünnungen für Western Blots

Antikörper	Verdünnung*
Anti-Beta-Actin (polyclonal, produced in rabbit)	1:5000
Anti-Histone-H2A (polyclonal, produced in rabbit)	1:2000
Anti-Histone-H2B (polyclonal, produced in rabbit)	1:500
Anti-Histone-H3 (polyclonal, produced in rabbit)	1:500
Anti-Histone-H4 (polyclonal, produced in rabbit)	1:500
Anti-Rabbit-Sekundärantikörper (produced in Goat)	1:5000

* Antikörper wurden mit Blockierungspuffer (5 % Magermilchpulver in TBST) verdünnt.

2.2.4.1.1 Coomassie-Färbung

Coomassie-Brillant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der zur Visualisierung von Proteinbanden verwendet wird, da er sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert. Die auf diese Weise stattfindende unspezifische Färbung ist das am häufigsten verwendete Verfahren nach der Auftrennung im Polyacrylamid-Gel. Die Nachweisgrenze für Coomassie R-250 liegt bei ca. 0,1 µg Protein pro Bande in einem Gel. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine (siehe Kapitel 2.2.4.1) wurden die Gele zuerst 30 min in der Fixierungslösung fixiert und anschließend 2 h mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Für eine bessere Abtrennung der Proteinbanden

vom Hintergrund wurde die überschüssige Farbe schließlich mit einer Entfärbelösung entfernt (mind. 2 h oder über Nacht).

Tabelle 19: Anleitung der drei Lösungen der Coomassie-Färbung

Fixierungslösung	Coomassie-Färbelösung	Entfärbelösung
50 % Methanol	0,05 % Coomassie-Brillant-Blau	10 % Essigsäure
10 % Essigsäure	50 % Methanol	90 % bidest. Wasser
40 % bidest. Wasser	10 % Essigsäure	
	40 % bidest. Wasser	

2.2.4.1.2 Ponceau-Färbung

Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet und zur Lokalisierung von Proteinbanden auf einer Nitrocellulosemembran verwendet wird. Im Gegensatz zu Coomassie-Brillant-Blau ist diese Färbung reversibel; die Membran kann anschließend für die Immundetektion weiter verwendet werden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung und Übertragung der Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran (siehe Kapitel 2.2.4.1) wurden die Membrane einmal kurz mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Ponceau-S-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) darüber gegeben und der Blot 10 min bei RT unter Schwenken gefärbt. Mit etwas bidest. Wasser wurde der Hintergrund entfärbt, um die nun rötlichen Proteinbanden hervorzuheben. Am Ende der Färbung kann wie gewohnt mit der Immundetektion fortgefahren werden.

2.2.4.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ebenfalls ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren zur Quantifizierung von Peptiden/Proteinen, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Beim hier verwendeten Sandwich-ELISA wird grundsätzlich das zu untersuchende Antigen aus dem Probenmaterial durch einen Antikörper an einer Oberfläche (Mikrotiterplatte) gebunden und konzentriert. Es schließt sich ein Waschschritt an, der nötig ist, um unspezifisch gebundene Antigene zu entfernen bzw. falsch positive Reaktionen zu verhindern. Durch die Zugabe eines sekundären Antikörpers, der gegen das Antigen gerichtet und mit einer fluoreszierenden Phosphatase oder Peroxidase markiert ist, kann durch die entstehende

Farbreaktion die gewünschte Substanz photometrisch quantifiziert werden. Dabei ist die Farbreaktion proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls. Mit Hilfe einer Kalibrierungskurve kann das Antigen quantifiziert werden. Die ELISAs der beiden Histone H2A und H2B wurden streng nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4.3 Immunhistologische Färbung

Bei dieser Färbemethode kann die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Gewebeschnitt sichtbar gemacht werden. Dabei wird die Reaktion zwischen Antigenen und spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern ausgenutzt. Durch eine Farbreaktion können die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe in einem zweiten Schritt detektiert werden.

2.2.4.3.1 Aufarbeitung der Proben

Für die folgenden immunhistologischen Färbungen wurden Kolongeweberesektate von Patienten mit Kolonkarzinomen untersucht. Nach Erhalt der Probe wurde die Mukosa abpräpariert und das Gewebe bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Ein Teil des Gewebes wurde zur Gewinnung von Gewebeschnitten in eine Kapsel für Gewebeproben überführt und über Nacht in Carnoy'scher Lösung inkubiert (Siehe Tabelle 20). Am nächsten Tag wurde das Gewebe 3 h in 100 % Isopropanol und anschließend 3 h in Xylol inkubiert. Über Nacht wurden die Kapseln in flüssigem Paraffin belassen und die Gewebeprobe am folgenden Tag in Blöcke gegossen.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Carnoy'schen Fixierlösung

Carnoy'sche Lösung	
Chemikalie/Reagenz	Volumen/Menge
Ethanol (96 %)	60 %
Chloroform (p.a.)	30 %
Eisessig (99 %)	10 %

Die so vorbereiteten Paraffinblöcke von Carnoy-fixiertem Kolonmukosagewebe wurden anschließend am Microtom geschnitten und 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden zum Glätten auf ein 38 °C warmes Wasserbad überführt und

auf Adhäsionsobjektträger gezogen. Die Schnitte wurden zur Fixierung des Gewebes über Nacht bei 56 °C im Brutschrank getrocknet. Danach konnten die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert werden.

2.2.4.3.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Zu Beginn der Behandlung wurden die Objektträger zuerst 30 min durch Neo-Clear® entparaffiniert. Neo-Clear® ist ein aliphatisches Kohlenwasserstoffgemisch, das Xylol im medizinischen Labor ersetzen soll. Anschließend folgte eine Rehydrierung der Objektträger durch eine abfallende Alkoholreihe und bidest. Wasser. Dabei wurden die Objektträger jeweils 2 min in 100 %igem Isopropanol, 96 %igem Ethanol, 70 %igem Ethanol und bidest. Wasser rehydriert. Für eine erfolgreiche Färbung der Schnitte ist meist eine Freilegung der Epitope nötig, vor allem wenn Formalin-fixierte Paraffinschnitte eingesetzt werden. Diese Demaskierung erfolgt meist durch Hitzebehandlung in Pufferlösungen oder durch Verdau mit proteolytischen Enzymen. Welche Vorbehandlung angewendet wurde hing von den jeweiligen Primäantikörpern ab.

Als proteolytisches Enzym wurde Pronase verwendet. Bei Pronasebehandlungen wurden die Objektträger für 30 min in einer Glasküvette mit 10 ml Pronase und 90 ml Sterufundin bei 37 °C inkubiert. Die Mischung muss bereits vor Verwendung auf 37 °C erwärmt werden. Für eine Hitzebehandlung der Schnitte wurden die Dampfarpuffer Target Retrieval Solution (10 x), pH 6 bzw. pH 9 (Dako), verwendet. Diese müssen vorher noch 1:10 verdünnt werden. Hierfür wurden jeweils 200 ml eines Puffers hergestellt (20 ml 10 x Puffer + 180 ml bidest. Wasser), der nicht häufiger als viermal wiederverwendet werden sollte. Die Schnitte wurden hierfür in einer Küvette mit dem entsprechenden Puffer für 30 min im heißen Dampfgerat behandelt.

2.2.4.3.3 Immunologische Färbung von Gewebeschnitten

Für die eigentliche immunologische Färbung wurden die vorbehandelten Gewebeschnitte mit zwei Tropfen Peroxidase-Blocking Solution, Dako Real (Dako) bedeckt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und 10 min in einer Feuchtkammer bei RT inku-

biert. Die Deckgläschen wurden anschließend wieder entfernt und 100 µl des Primärantikörpers aufgetropft (Liste aller verwendeten Primärantikörper und deren Verdünnungen siehe Tabelle 21). Die Konzentration sollte nach Herstellerangaben ausgewählt und der Antikörper mit dem Antibody Diluent, Dako Real (Dako) verdünnt werden. Die Objektträger wurden wiederum mit einem Deckgläschen bedeckt und über Nacht in der Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen entfernt und die Gewebeschnitte dreimal je 5 min gewaschen (1 x mit Waschpuffer (Rezept siehe Tabelle 22), 1 x mit bidest. Wasser, 1 x mit Waschpuffer). Nachdem der überschüssige Primärantikörper durch das Waschen entfernt wurde, wurden auf jeden Schnitt 2 Tropfen HRP-konjugierter Sekundärantikörper aufgetragen, die Objektträger mit einem Deckgläschen bedeckt und 30 min bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Die Sekundärantikörpermoleküle sind zusammen mit zahlreichen Peroxidase (HRP)-Molekülen an ein Dextranpolymer gekoppelt. Bei Zugabe der Substratlösung, die Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid enthält, wird ein braunes Farbprodukt gebildet und der Antigen-Antikörper-Komplex auf diese Weise visualisiert. Hierfür wurde vor Gebrauch frisch eine DAB-Färbelösung gemischt. Zu 1 ml Färbelösung müssen zwei Tropfen DAB⁺ gegeben werden. Von dieser Lösung wurden 100 µl auf jeden Gewebeschnitt gegeben, mit einem Deckgläschen bedeckt und 10 min bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper und die DAB-Färbelösung wurden dem En Vision Detection System Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse Kit (Dako) entnommen.

Nach der Färbung wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser 5 min gespült und mit Hämalaun 15 bis 30 sek gegengefärbt. Die überschüssige Farbe wurde auch hier durch 5 min Spülen unter fließendem Leitungswasser entfernt. Ein Bestandteil von Hämalaun ist das Hämatoxylin, ein natürlicher Inhaltsstoff von Blauholz, das zum Färben von Zell- und Gewebestrukturen wie Zellkernen, Mitochondrien, Myelin, Elastin und Kollagenfasern angewendet wird. Hämalaun wird nach der DAB-Färbung als Gegenfärbung angeschlossen. So können positive Ergebnisse durch eine rötlich-braune Färbung (DAB) und negative Ergebnisse als bläuliche Färbung identifiziert werden. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte durch eine aufstei-

gende Alkoholreihe (70 %iges Ethanol, 96 %iges Ethanol und 100 %iges Isopropanol) entwässert, mit 3 Tropfen des Eindeckmittels Neomount beschichtet und mit Deckgläsern abgedeckt. Die Gewebeschnitte wurden am Lichtmikroskop untersucht.

Tabelle 21: Liste aller für die Immunhistochemie verwendeter Primärantikörper und ihre jeweiligen Verdünnungen

Detektiertes Peptid/Protein	Primärantikörper		Verdünnung
	Bezeichnung	Firma	
H2A	Histone H2A Antibody, mouse monoclonal	Antikörper-online	1:100
H2B	Histone H2B Antibody, Rabbit monoclonal	NovusBio	1:100
H3	Histone H3 Antibody, Mouse monoclonal	St. John's Laboratory	1:100
H4	Histone H4 Antibody, Rabbit monoclonal	NovusBio	1:100
Histon gesamt	Histone Antibody, Mouse monoclonal	Antikörper-online	1:100

Tabelle 22: Anleitung für die Herstellung des Waschpuffers

TBS-Waschpuffer (10 x)*		
Chemikalie/Reagenz	Menge/Volumen	
NaCl	80 g	} pH 7,4 einstellen
KCl	2 g	
Tris	30 g	
Bidest. H ₂ O	Ad 1000 ml	

* Für die Verwendung als TBST-Waschpuffer (1 x) wurde der Puffer 10-fach mit bidest. H₂O verdünnt und 0,1 % Tween 80 hinzugefügt.

2.2.4.4 Extraktion von Histonen

Die Extraktion von Histonen folgt generell einem von drei grundlegenden Methoden: (1) Säureextraktion mit starker Salz- oder Schwefelsäure (HCl, H₂SO₄), (2) Behandlung mit Natriumchlorid und Urea oder (3) Salzextraktion. Nach jeder dieser Trennungsmethoden erfolgt eine Zentrifugation. In den entstandenen Pellets finden sich nichtdissoziierte Protein-DNA-Komplexe. Generell werden Histone durch Ionenaustausch-Chromatographie oder Versäuerung getrennt. Aufgrund ihrer hohen Affinität für DNA, ihrer Neigung sich in Anwesenheit von DNA oder anderen starken Denaturierungsmitteln zusammenzuballen und einer möglichen proteolytischen

Zersetzung während der anhaltenden Isolation im Verlauf ihrer Aufarbeitung, ist das Herauslösen dieser Proteine problematisch. (Bloom und Anderson 1978, Shechter, et al. 2007)

In dieser Arbeit wurden die Histone mit dem EpiSeeker Histone Extraction Kit von Abcam aus Kolonresektaten, -biopsien und Mukusabstrichen herausgelöst. Die Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Von den Resektaten wurde die optimale Ausgangsmenge von 100 mg Gewebe abgemessen (die restlichen Proben wurden gewogen und die entsprechende Ausgangsmenge verrechnet), in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und nach Zugabe von 500 µl des Pre-Lyse-Puffers mit dem „Turrax“-Stabmixer komplett homogenisiert. Durch gutes Vortexen sollten die Gewebestücke voneinander getrennt werden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 1 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 2 h. Daraufhin wurde die Mixtur bei 12 000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit den säurelöslichen Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen. Nach Zugabe von 90 µl Balancepuffer (+ DTT), wurde die Proteinkonzentration am Photometer bestimmt. Die Lagerung der Histonextrakte erfolgte bei -20 °C.

2.2.4.5 Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Die aus drei Resektaten mit Mukus (Kontrollpatienten mit der Bezeichnung: RM25, RM44 und RM65) gewonnenen Histonextrakte wurden mittels RP-HPLC in einzelne Fraktionen separiert.

Im Allgemeinen dient das Flüssigchromatographieverfahren zur Auftrennung von Substanzgemischen. Dabei werden Lösungsmittel mit einer angepassten Flussrate durch eine Trennsäule mit der darin befindlichen festen stationären Phase gepumpt. Die hohe Trennleistung wird durch sehr kleine druckstabile Packungsteilchen (< 10 µm), pulsationsarme Pumpen, hohen Druck (bis 400 bar), entsprechenden Injektionsystemen und miniaturisierte Detektoren erreicht. Das zu trennende Substanzgemisch wird auf die Säule injiziert und während der Wanderung durch die Trennsäule in seine Komponenten aufgetrennt. Am Ende der Säule werden die Bestandteile

durch einen Detektor aufgezeichnet. Bei der Detektion wird vor allem die UV-Absorption bei 210 nm für Peptide oder 254/280 nm für Proteine verwendet. Bei der Umkehrphasenflüssigchromatographie kommen chemisch modifizierte Kieselpartikel als stationäre Phase zum Einsatz; im Gegensatz zu der Normalphasenchromatographie, bei der die stationäre Phase polar ist. Aufgrund kovalenter Bindungen zwischen dem Kieselgel und Alkylketten (z.B. Octadecyl- bzw. C₁₈-Ketten) verhalten sie sich hydrophob. Mit zunehmender Kettenlänge werden die Eigenschaften unpolarer. Dabei werden vor allem polare mobile Phasen wie Wasser, Acetonitril, Methanol oder Gemische daraus verwendet. Auch die Zusammensetzung der mobilen Phase kann sich während der Elution verändern (Gradientenelution). Auf diese Weise lassen sich in polaren Lösungsmitteln lösliche Substanzen trennen und durch Verwendung eines Gradienten zusätzlich noch die Elutionskraft erhöhen.

Für die folgenden Versuche wurde eine HPLC der Agilent 1200 Serie mit der Systemsoftware ChemStation (Agilent) für die Auswertung der Daten und eine Zorbax 300SB-C18 Trennsäule (4,6 x 150 mm; 3,5 µm; Agilent, Waldbronn) verwendet. Die besten Trennleistungen zeigten sich dabei mit einer Flussrate von 1 ml/min und dem in Tabelle 23 aufgeführten Lösungsmittelgradienten. Für die HPLC-Läufe wurden jeweils 300 µg Histonextrakt aufgetragen. Zunächst wurde die Säule 15 min mit 99 % Fließmittel A (0,18 % TFA in Millipore-Wasser) und 1 % Fließmittel B (0,15 % TFA in Acetonitril) konditioniert. Erst im Anschluss daran wurde die Gradientenelution durchgeführt und die gewünschten Fraktionen gesammelt. Die gleichen Fraktionen wurden gepoolt und nachfolgend lyophilisiert, um das in den Fraktionen enthaltene Acetonitril zu entfernen. Die HPLC-Fraktionen wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 23 Zusammensetzung des verwendeten Lösungsmittelgradienten der HPLC-Analysen

Mobile Phase	Prozentsatz	Zeit [min]
Fließmittel B (0,15 % TFA in Acetonitril)	1 % auf 30 %	10
Fließmittel B	30 % auf 60 %	30
Fließmittel B	60 % auf 1 %	5
Fließmittel B	1 %	5

2.2.4.6 Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Die Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion (MALDI-TOF-MS) wird für die Bestimmung von Molmassen großer Moleküle verwendet. Nach der Fraktionierung der Histonextrakte aus den Resektaten wurden die gewonnen HPLC-Fractionen mit dieser Methode untersucht und der Molekulargewichtsbereich zwischen 0 und 19 kDa analysiert.

MALDI-TOF-MS ist ein Verfahren, mit dem Polymermoleküle mittels Laserbeschuss aus einer niedermolekularen Matrix heraus unzerstört verdampft werden können. Dafür wird die Probe mit einer geeigneten, konzentrierten Matrixlösung vermischt und auf einen metallischen Probenträger (Target) aufgebracht. Als Matrix für UV-Laser finden unter anderem Dithranol (1,8-Dihydroxy-9-Anthron), Nicotinsäure, Sinapinsäure, α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure etc. Verwendung. Nach Verdunstung des Lösemittels entsteht eine teilkristalline Schicht, in der das Probenmaterial komplett in das Matrixkristallgitter eingebaut wurde und so im Idealfall die Probenmoleküle vollständig voneinander getrennt sind. Die auf diese Weise behandelte Probe wird im Hochvakuum durch einen fokussierten Laserstrahl des Massenspektrometers explosionsartig verdampft, was zu einer Ionisierung der Moleküle führt. Durch eine Hochspannungsquelle wird ein elektrostatisches Feld mit 10 bis 30 kV aufgebaut, durch das die Ionen in Richtung des Analysators beschleunigt werden. Diese Massenanalytoren ermitteln die Flugzeit der Analyten zwischen ihrem Start in der Ionenquelle und der Ankunft am Detektor. Im Vakuum ist es möglich die Flugzeit der Moleküle genau zu bestimmen, wobei sowohl der Ionisierungsgrad als auch die Masse der Proteine Einfluss nehmen. Durch das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung, das proportional zur Flugzeit im Quadrat ist, kann auf das m/z -Verhältnis der Ionen rückgeschlossen und ein Gesamtspektrum dargestellt werden.

Für die folgenden Versuche wurde ein Bruker Ultraflex TOF/TOF-Gerät sowie THAP (2',4',6'-Trihydroxyacetophenone monohydrate)/DAHC (Diammonium hydrogen citrate) als Matrix verwendet: 5 mg THAP wurden in 125 μ l Acetonitril und 205 μ l Millipore-Wasser sowie 25 mg DAHC in 250 μ l Millipore-Wasser gelöst. An-

schließlich wurden 125 µl der DAHC-Lösung zum THAP gegeben und gut gemischt. Dies entsprach im Endeffekt einer Konzentration von 10,98 mg/ml THAP und 27,47 mg/ml DAHC gelöst in 27,47 % Acetonitril/72,53 % Millipore-Wasser. Für die Analyse der HPLC-Fractionen aus Resektaten wurde ein Volumen von 0,75 µl der Fraktion mit 0,75 µl THAP/DAHC-Matrix auf einen Stahltarget kokristallisiert. Nach dem Trocknen bei RT konnte das Target in das Massenspektrometer eingesetzt werden. Mittels Videokamera wurde eine Probe ausgewählt und durch die Systemsoftware FlexAnalysis Version 2.2 und FlexControl Version 2.2 analysiert.

2.2.5 Mikrobiologische Methoden

2.2.5.1 Anzucht von *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*

Die Kultivierung von *E. coli*, *S. aureus* und *C. albicans* erfolgte, soweit im Folgenden nicht anders beschrieben, in Schaedler Flüssigmedium (1:6 verdünnt) bzw. auf Columbia-Blutagarplatten (5 % Schafblut) im Brutschrank bei 37 °C. Die Platten konnten im Anschluss im Kühlschrank bei 4 °C für einige Tage gelagert werden. Bis auf den Stamm *E. coli* K12 wurden die Versuche unter L2-Bedingungen in den Alb Fils Kliniken in Göppingen im S1-Labor durchgeführt.

2.2.5.2 Anzucht anaerober Bakterienstämme

Die Anzucht der Bifidobakterien (*Bifidobacterium adolescentis* und *B. longum*) und der Bacteroides-Stämme (*Bacteroides vulgatus* und *B. fragilis*) erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Als normale Bewohner des menschlichen Magen-Darm-Traktes sind sie nicht in der Lage molekularen Sauerstoff für ihr Wachstum zu verwerten. Daher wurde für die Kultivierung der Flüssig- und Festmedien ein Anaerobiertopf mit aktiviertem AnaeroGen™ (*Atmosphere Generation System*) verwendet. Dieses System reduziert das Sauerstoffniveau innerhalb von 30 min auf unter 1 %. Das daraus resultierende Kohlendioxid pendelt sich zwischen 9 und 13 % ein. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Anzucht in unverdünntem Schaedler Flüssigmedium und auf Columbia-Blutagarplatten im Brutschrank bei 37 °C. Die Durchführung der Ver-

suche mit den Bacteroides-Stämmen fand ebenfalls in den Alb Fils Kliniken in Göttingen statt.

2.2.5.3 Anzucht der *Clostridium difficile*-Stämme

Die Anzucht der Clostridien erfolgte ebenfalls unter anaeroben Bedingungen unter Verwendung eines Anaerobiertopfs mit aktiviertem AnaeroGen™. Soweit nicht anders beschrieben, fand die Kultivierung in unverdünntem Schaedler Flüssigmedium und auf Columbia-Blutagarplatten im Brutschrank bei 37 °C statt. Während den gesamten Clostridienversuchen wurden die Bakterienlösungen und -platten strikt unter dem Abzug mit Handschuhen behandelt.

2.2.5.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FCM, *Flow Cytometrie*; FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) wird verwendet, um physikalische und biologische Eigenschaften auf Zellebene zu untersuchen. Grundlage ist eine (gefärbte) Einzelzellsuspension: Zellen passieren einzeln einen fokussierten Laserstrahl und erzeugen so ein charakteristisches Streu- und Fluoreszenzlicht, woraus die Eigenschaften der Zelle abgeleitet werden können. Mit dieser Methode ist es möglich, simultan mehrere Parameter bei einer großen Anzahl Zellen zu detektieren. Im Bereich der Mikrobiologie lassen sich so Werte wie Größe, Granularität, Membranpotenzial, Enzymaktivität und Vitalität bei Mikroorganismen erfassen.

2.2.5.4.1 Durchflusszytometrischer Vitalitätstest

Die antimikrobielle Aktivität von rekombinanten Histonen und Defensinen wurde alleine und in Kombination gegen verschiedene Bakterienstämme getestet. Dabei wurde das etablierte Verfahren von Nuding et al., 2006 angewendet (Nuding, et al. 2006). Wichtigstes Element einer solchen Versuchsreihe ist die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Hierfür wird der Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₄(3) (Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol) verwendet, der eine sehr hohe Spannungssensitivität hat und in depolarisierte Zellen eindringen kann, wo er an lipidrei-

che intrazelluläre Komponenten bindet. Die Steigerung der Fluoreszenz bei toten Zellen kann innerhalb einer Bakterienpopulation durchflusszytometrisch erfasst und auf diese Weise von lebenden Zellen unterschieden werden.

Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C in Schaedler-Bouillon angezogen. Für *E. coli* wurde das Flüssigmedium vorher mit sterilem bidest. Wasser für Injektionszwecke 1:6 verdünnt. Diese Übernachtkultur wurde am nächsten Tag ebenfalls mit Schaedler-Bouillon auf eine optische Dichte von 0,05 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) eingestellt. Inkubiert wurde die Folgekultur bei 37 °C im Brutschrank für 30 bis 60 min, um zu gewährleisten, dass sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Bei einer optischen Dichte von 0,1 wurden die Zellen 1:10 oder 1:2 mit Schaedler-Bouillon verdünnt und der restliche Reaktionsansatz auf 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe der zu testenden Substanzen (Histone und Defensine) erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 90 min. Als Negativkontrolle diente Schaedler-Bouillon; als Positivkontrolle 2 µl rekombinant hergestelltes HBD3 (PeptaNova, Sandhausen; Stammlösung: 1 µg/µl). Anschließend wurden je 2 µl DiBAC₄(3)-Gebrauchslösung (siehe Tabelle 24) zugefügt. Die Ansätze wurden für 10 min bei RT inkubiert und dann bei 6000 rpm für 3 min zentrifugiert. Währenddessen wurden für jeden Reaktionsansatz 200 µl steril filtriertes FACS-Flow in FACS-Röhrchen vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Pellets mit 100 µl PBS gelöst und diese Lösung in die vorbereiteten FACS-Röhrchen überführt. Die Messungen erfolgten an einem FACSCalibur-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (Sparks, MD, USA). Je Probe wurden 10 000 Events mit der Cell Quest Software analysiert.

Tabelle 24: Anleitung DiBAC₄(3)-Stammlösung

Chemikalien/Reagenzien	Menge/Volumen	
DiBAC ₄ (3)	5 mg	} DiBAC ₄ (3) in Methanol lösen und mit sterilem bidest. H ₂ O 1:20 verdünnen (Gebrauchslösung)
Methanol	500 ml	

Abbildung 5 ermöglicht einen kurzen Überblick über die durchgeführten durchflusszytometrischen Versuche. Die Bakterienpopulation wurde zunächst in einem Dotplot eingegrenzt. In der anschließenden Histogrammdarstellung ist nach oben

hin die Häufigkeit aufgetragen, nach rechts hin die Fluoreszenzintensität (FL1) von Gate R1. Durch diese Darstellungsart können Unterschiede der Fluoreszenz visualisiert werden. Die höhere FL1 der mit HBD3 und den kationischen Kolonbiopsieextrakten behandelten Bakterienzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ist in diesem Beispiel deutlich zu erkennen.

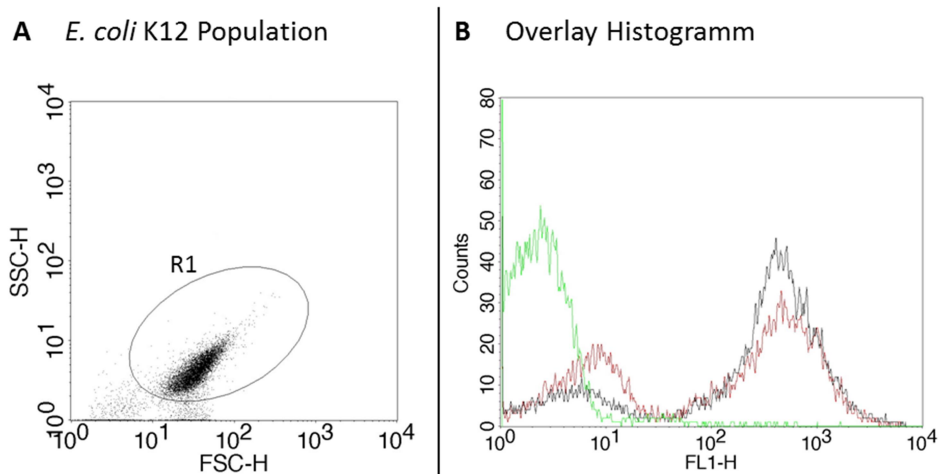


Abbildung 5 FACS Dotplot der *E. coli* K12 Population und Overlay Histogramm der FL-1-Fluoreszenz. (A) Dargestellt ist der Populationsdotplot (FSC vs. SSC) von unbehandelten *E. coli* K12-Zellen, die mit Hilfe des R1-Gates umkreist wurden. (B) Overlay Histogramm von Gate R1 der unbehandelten *E. coli* K12-Zellen (grün) sowie der mit HBD3 (rot) und einem kationischen Extrakt der Kolonbiopsie (schwarz) behandelten Zellen. Gemessen wurde nach der Inkubation mit dem fluoreszierenden Farbstoff DiBAC₄(3).

2.2.5.5 Radial Diffusion Assay (RDA)

Neben dem durchflusszytometrischen Vitalitätstest wurde die antimikrobielle Aktivität der Kernhistone zusätzlich noch mit dem *Radial Diffusion Assay* (RDA) nach Lehrers modifizierter Methode untersucht (Lehrer, et al. 1991b). Dabei werden Bakterien auf einem speziellen Nährmedium betrachtet und mit der zu testenden Probe inkubiert. Dabei findet eine Agarose mit besonders wenigen Einlagerungen Verwendung, um eine Diffusion der Probe zu ermöglichen.

Als Kulturmedium wurde 1:3-verdünntes Schaedler-Broth verwendet, von dem pro Platte 10 ml zusammen mit 0,1 g Agarose LE *low electroendosmosis* bei 400 W in einer Mikrowelle ca. 1 min aufgekocht und anschließend in eine leere sterile Petrischalen gegossen wurde. Die Platten konnten bei RT abkühlen und wurden bis zum weiteren

Gebrauch im Kühlschrank gelagert. Für den RDA-Test wurden die festen Kulturböden mit einer Bakteriensuspension mit einer Zelldichte von 0,5 McFarland Standard (entspricht ca. $1,5 \cdot 10^8$ Zellen) bestrichen. Verwendet wurde hierfür ein steriles Wattestäbchen, das dreimal in die Bakteriensuspension getaucht und auf der Platte verstrichen wurde, sodass ein gleichmäßiger Bakterienrasen entstand. Daraufhin wurden mit einer sterilen Biopsiestanze (\varnothing 3 mm) entsprechend viele Löcher in den Agar gestanzt und diese mit 3 μ l der zu testenden Substanz befüllt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 48 h bei 37 °C aerob oder anaerob in entsprechenden Anaerobiertöpfen mit aktiviertem AnaeroGen™. Je nach Größe des entstandenen Durchmessers im Bakterienrasen der zu untersuchenden Probe können Rückschlüsse auf die Stärke der antimikrobiellen Aktivität gezogen werden.

2.2.5.6 Clostridien-Toxintest

Um die Toxinproduktion von *C. difficile* nachzuweisen, wurde der Ridascreen® Enzymimmunoassay von R-Biopharm verwendet. Dieses Kit ist geeignet die Toxine A/B in humanen Stuhlproben und aus Kulturen von zuvor aus Stuhlproben angezüchteten toxinbildenden *C. difficile*-Stämmen nachzuweisen.

Für den Toxintest wurden die Clostridien ein bzw. mehrere Tage in unverdünntem Schaedler-Nährmedium in einem Anaerobiertopf mit aktiviertem AnaeroGen™ bei 37 °C kultiviert (siehe Kapitel 2.2.5.3). Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit unverdünntem Schaedler auf eine optische Dichte von 0,5 eingestellt und je 100 μ l zusammen mit den zu testenden Substanzen (Histone bzw. Histonkombinationen) in einem 2 ml Eppi bei 37 °C für 60 min inkubiert. Je 100 μ l der Proben wurden daraufhin in die im Kit enthaltene 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und nach Herstellerangaben behandelt. Dabei sind die ersten beiden Wells für die Positiv- bzw. Negativkontrolle des Kits reserviert. Jeweils zwei Tropfen Positivkontrolle wurden mit einer Plastikpipette in das erste Well pipettiert und zwei Tropfen Negativkontrolle in das zweite. Danach wurden zwei Tropfen Konjugat 1 zu jeder Probe und zu den Kontrollen pipettiert und die Platte bei RT 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünf Mal mit dem mit Aqua dest. 1:10 verdünnten Waschpuffer gewaschen. Hierfür wurde jedes Well mit Waschpuffer gefüllt und der Inhalt auf einem saugfä-

higen Papier wieder entfernt. Die Prozedur wurde viermal wiederholen. Danach wurde zu jedem Well zwei Tropfen Konjugat 2 gegeben, die Platte 30 min bei RT inkubiert und anschließend wieder fünf Mal gewaschen. Zwei Tropfen Substrat wurden zugegeben und die Platte bei RT 15 min abgedunkelt inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde ein Tropfen Stopplösung hinzugegeben, um die Reaktion zu beenden. Die Platte wurde anschließend in einem Plattenlesegerät bei 450/620 nm gemessen und die Extinktionswerte bestimmt. Nach Herstellerangabe sollte die Negativkontrolle unter 0,2 und die Positivkontrolle über 0,8 liegen. Der Cut-off ist die Extinktion der Negativkontrolle bei +0,15.

2.2.5.7 Elektronenmikroskopie

Die genaue Wirkungsweise der Histone gegen *E. coli* und *C. difficile* sollte mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen visualisiert werden. Dafür wurden $1,5 \times 10^7$ Bakterien/ml mit den Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4 oder mit einer Kombination von H2B und H3 in einer Konzentration von 50 µg pro 500 µl Bakteriensuspension behandelt und 2 h bei 37 °C inkubiert; unbehandelte Bakterien dienten als Kontrolle. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 7000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung in Karnovsky-Lösung fixiert. Die Pellets wurden dann in 3,5 %iger Agarose bei 37 °C eingebettet und wiederum in Karnovsky-Lösung fixiert. Die letzte Fixierung wurde für 2 h mit einer Lösung aus 1 % Osmiumtetroxid mit 1,5 % Kalium-Ferrocyanid in 0,1 M Kakodylat durchgeführt. Danach wurden die Proben in Glycidether eingebettet. Alle Lösungen wurden von der Universitäts-Hautklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Die 20 bis 30 nm dünnen Schnitte wurden auf unbeschichteten Kupfergittern gefärbt und durch ein Zeiss LIBRA 120 Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) visualisiert. Die letzte Einbettung, die Schnitte und die Elektronenmikroskopie wurden ebenfalls an der Universitäts-Hautklinik Tübingen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Teil 1 – Systematische Analyse der Kernhistone im Kolon

Das Vorkommen der Histone H2A und H2B in Mukusextrakten konnte bereits in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt werden (Antoni 2012). Zur Vertiefung der dabei gewonnenen Ergebnisse wurden nun die gesamten Kernhistone (H2A, H2B, H3 und H4) im Kolongewebe systematisch analysiert. Hierfür wurden 92 Kolonbiopsien gesammelt, aufgearbeitet und hinsichtlich ihrer Gen- bzw. Proteinexpression miteinander verglichen. Da es viele Faktoren gibt, die die kodierende Gensequenz regulatorisch beeinflussen können, wurden die mRNA-Expressionslevel (Quantitative RT-PCR) gemessen und die tatsächlich vorliegende Proteinkonzentration (Western Blot) bestimmt. Abschließend wurden die isolierten kationischen Peptide des Kolongewebes auf ihre antimikrobielle Aktivität hin untersucht. Einen Überblick über die durchgeführten Analysen gibt Abbildung 6.

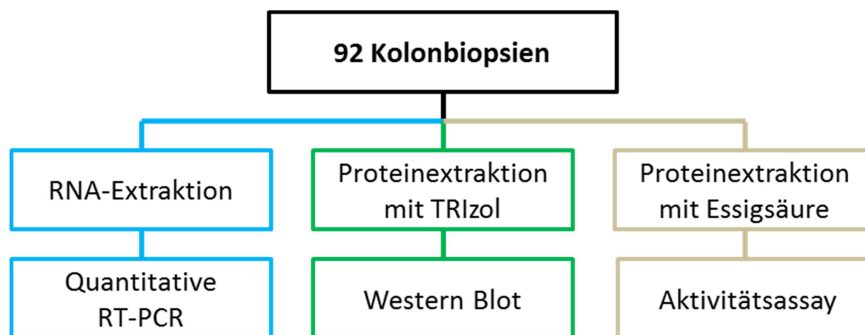


Abbildung 6 Überblick der mit Kolonbiopsien durchgeführten Gen- (blau), Proteinexpression (grün) und Aktivitätsanalysen (grau). Für jeden Bereich wurde je eine Biopsie individuell aufgearbeitet.

3.1.1 Das Kollektiv

Die Kolonbiopsien wurden von der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart während einer Koloskopie entnommen und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kolonbiopsien wurden in fünf Gruppen eingeteilt: die gesunden Kontrollen, MC und CU entzündet (infl) und nicht entzündet (non).

Tabelle 25: Übersicht über die im Kollektiv enthaltenen Kolonbiopsien und Einteilung in die jeweilige Gruppe.

Kolonbiopsie				Gruppe	Anzahl (n)
1082-3	1125-3	1426-2	1389-2	Kontrolle, K	20
1088-3	1129-3	1422-2	1387-2		
1090-3	1100-3	1421-2	1386-2		
1093-3	1131-3	1413-2	1384-2		
1097-3	1138-3	1403-2	1376-2		
1045-3	1102-3	1479-2	1433-2	Morbus Crohn, nicht entzündet, MC non	20
1085-3	1103-3	1473-2	1428-2		
1091-3	1139-3	1430-2	1425-2		
1070-3	1142-3	1459-2	1424-2		
1099-3	1150-3	1450-2	1356-2		
1050-3	1346-3	1460-2	1047-3	Morbus Crohn, entzündet, MC infl	16
1071-3	1374-3	1153-3			
1089-3	1382-3	1069-3			
1456-3	1399-3	1057-3			
1327-3	1420-3	1055-3			
1068-3	1217-3	1474-2	1444-2	Colitis ulcerosa, nicht entzündet, CU non	20
1073-3	1067-3	1475-2	1443-2		
1075-3	1252-3	1465-2	1394-2		
1076-3	1289-3	1457-2	1392-2		
1080-3	1303-3	1445-2	1377-2		
1049-3	1202-3	1447-2	1147-3	Colitis ulcerosa, entzündet, CU infl	16
1064-3	1203-3	1447-2			
1084-3	1213-3	1429-2			
1056-3	1246-3	1393-2			
1260-2	1255-3	1304-2			
				Total Σ	92

3.1.2 Quantifizierung der Genexpression der Kernhistone in Kolonbiopsien

Für Genexpressionsversuche ist die Qualität der eingesetzten Proben entscheidend. Aus diesem Grund wurde die isolierte totale RNA nur dann für die cDNA-Synthese eingesetzt, wenn keine optische Degradierung auf den Agilent-Chips und keine Kontamination der RNA mit Proteinen zu erkennen waren. Als Vergleichswert wurde die so genannte *RNA Integrity Number* (RIN) herangezogen und nur RNA-Proben mit einem sehr hohen RIN-Wert (> 8) verwendet (siehe Kapitel 2.2.3.3). Histone werden aufgrund ihrer Funktion in allen Geweben gleichermaßen exprimiert. Die folgende Untersuchung soll zeigen, ob es zwischen Gesunden und Menschen mit CED einen Unterschied bei der Genexpression der Kernhistone gibt. Die Genexpression der His-

tone H2A, H2B, H3 und H4 wurden mit Hilfe quantitativer Real-time PCRs an einem Lightcycler 480 (siehe Kapitel 2.2.3.6) in Kolonbiopsien ermittelt. In Abbildung 7 sind die mRNA-Expressionsergebnisse der vier Kernhistone dargestellt. Die angegebenen Kopienzahlen wurden mit Hilfe einer Standardkurve errechnet.

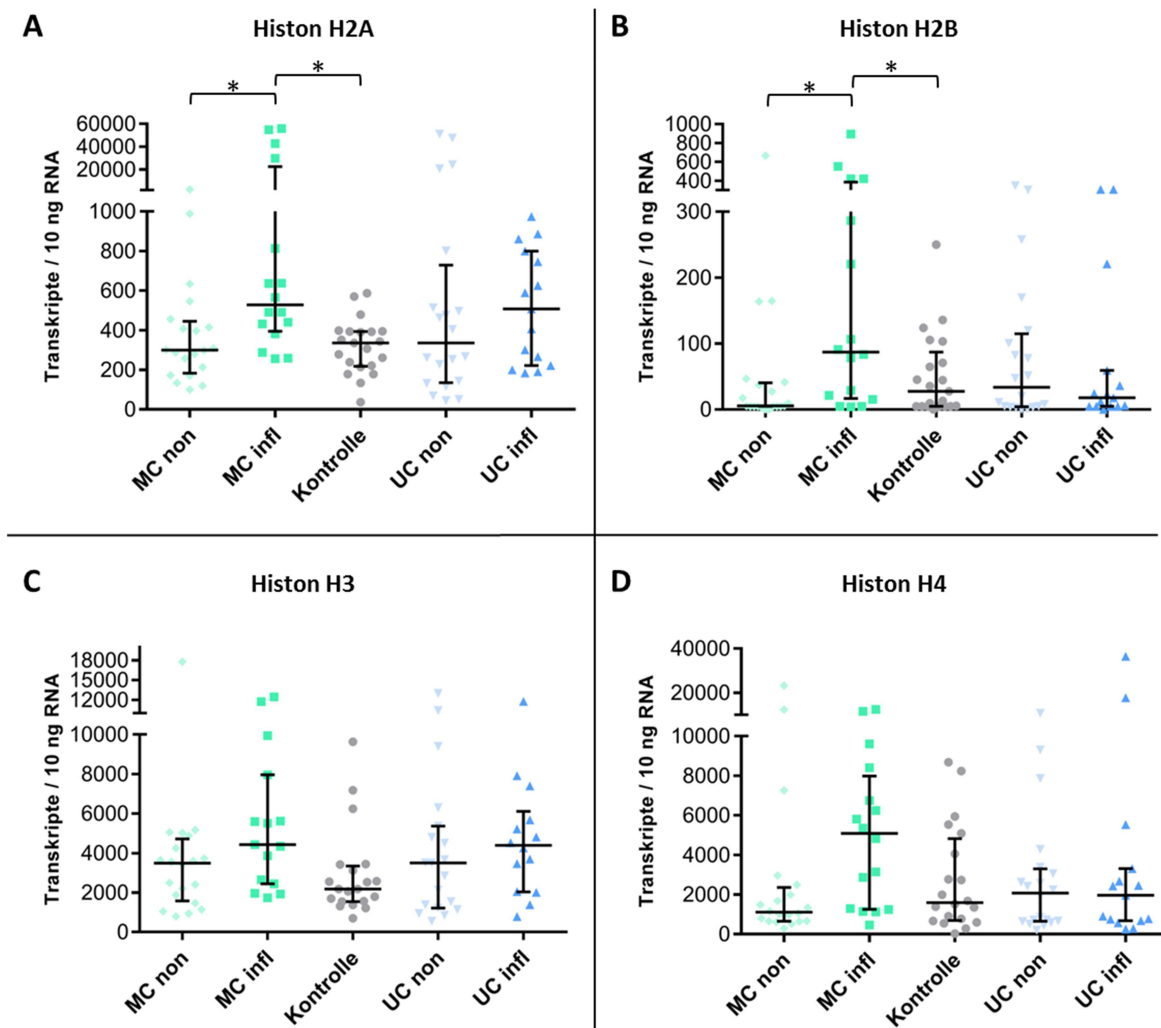


Abbildung 7 mRNA-Expression der Kernhistone (A) H2A, (B) H2B, (C) H3 und (D) H4. Dargestellt ist die Anzahl der jeweiligen Histontranskripte pro 10 ng Gesamt-RNA, die in den Kolonbiopsien gemessen werden konnten (* = $p < 0,05$).

Grundsätzlich lässt sich in Abbildung 7 eine Zweiteilung der untersuchten mRNA-Expression bei den Kernhistonen erkennen. Der Großteil der Kolonbiopsien ist mit einer mRNA-Expression von ca. 1000 (H2A und H2B) bis ca. 10000 Transkripten pro 10 ng Gesamt-RNA (H3 und H4) im unteren Bereich der Abbildungen zu finden. Einige Proben zeigten bei H2A, H3 und H4 eine stark erhöhte Genexpression mit

weit über 20000 Transkripten pro 10 ng Gesamt-RNA. Diese Spannweite der Expressionsstärke der Kernhistone lässt sich bei allen Erkrankungen feststellen. Weiterhin ist bei allen Kernhistonen ein Trend in der Erhöhung der Gruppe MC infl zu erkennen, der bei H2A und H2B im Vergleich zu den gesunden Kontrollen sowie MC non sogar signifikant ist. Die große Streuung innerhalb der Gruppen macht eine Interpretation der Ergebnisse jedoch schwierig.

3.1.3 Quantifizierung der Proteinexpression der Kernhistone in Kolonbiopsien

Neben der Bestimmung der Genexpression wurde die Proteinkonzentration der Kernhistone quantifiziert. Dafür wurde je eine Kolonbiopsie des Kollektivs nach der in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Methode mit TRIzol (siehe Kapitel 2.2.2.2) aufgearbeitet. Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach Bradford (siehe Kapitel 2.2.2.3). Zur Quantifizierung der Proteinexpression wurde die Methode des Western Blottings gewählt (Durchführung siehe Kapitel 2.2.4.1). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des komplex zusammengesetzten Gesamtproteingemischs und Immobilisierung der Proteine auf eine geeignete Membran, erfolgte die Immunodetektion der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 mit Hilfe spezifischer Antikörper (siehe Tabelle 18).

Die Funktionsfähigkeit der Proben wurde mit dem „housekeeping gene“ β -Aktin nachgewiesen. Mit einem Molekulargewicht von rund 42 kDa wird dieses Gen in allen Zellen konstitutiv, also unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen gleichermaßen exprimiert. Bei Western Blots kann das β -Aktin-Protein als Ladungskontrolle herangezogen werden. Wenn nötig können auch die korrespondierenden Werte anderer Proteine bei der Proteinexpression in Verhältnis gesetzt werden. Für die Western Blots wurden jeweils 12 % Bis-Tris-Gele mit drei aufsteigenden Konzentrationen des jeweiligen rekombinanten Histonproteins und mit 6 bzw. 12 μ g des Probenmaterials beladen (siehe Kapitel 2.2.4.1). In Abbildung 8 ist exemplarisch ein Western Blot von zehn Patienten der Kontrollgruppe gegen das Histon H2A dargestellt.

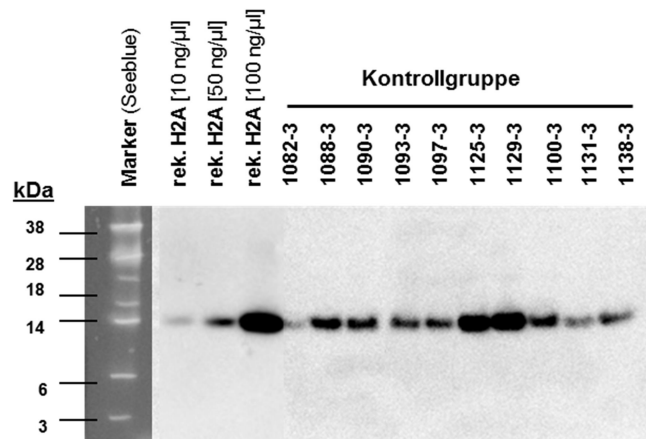


Abbildung 8 Exemplarische Darstellung eines Western Blots von 10 Patienten der Kontrollgruppe gegen Histon H2A. Von den Proben wurden 6 μg Gesamtprotein aufgetragen. Als Vergleichsgröße wurden ebenfalls drei Konzentrationen (10, 50 und 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$) des rekombinanten Histons H2A aufgetragen.

Bereits in diesem Beispiel zeigt sich, dass innerhalb derselben Gruppe Proteine unterschiedlicher Proben unterschiedlich stark exprimiert werden. Lediglich drei der vier untersuchten Kernhistone zeigten Hauptbanden auf der zu erwartenden Höhe ihrer jeweiligen molekularen Massen: H2A, H3 und H4 auf Höhe von 14, 15 und 11 kDa. Eine Ausnahme stellte H2B dar, da hier bei allen durchgeführten Western Blots keine Hauptbande bei 14 kDa zu erkennen waren (Daten nicht dargestellt). Die Veränderung des Laufverhaltens ist wahrscheinlich durch Bindung der Histone an andere Proteine, oder andere Histone sowie durch Modifikationen der Histonproteine zu erklären.

Die Auswertung der Western Blot-Banden erfolgte anschließend mittels der AIDA Image Analyzer Software, die die Proteinkonzentration mit der Bandenintensität korreliert. Als Zahlenwerte umgerechnet können die aus den Banden gewonnenen Daten miteinander verglichen werden.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der Histonkonzentrationen graphisch dargestellt. Dabei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen. Innerhalb der Gruppen liegt eine starke Streuung der Kontroll- und Patientenproben vor. Die Expression der vier getesteten Histone liegt in einem ähnlichen Bereich: Die Histone H2A und H4 zeigen eine Histonexpression von durchschnittliche 300 $\text{ng}/12 \mu\text{g}$ Gesamtprotein; die Expression der Histone H2B und H3

liegt mit Werten von durchschnittlich 5000 und 800 ng/12 µg Gesamtprotein im Vergleich etwas höher. Somit lassen sich auf Proteinebene keine Unterschiede in der Kernhistonexpression zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten mit CED erkennen.

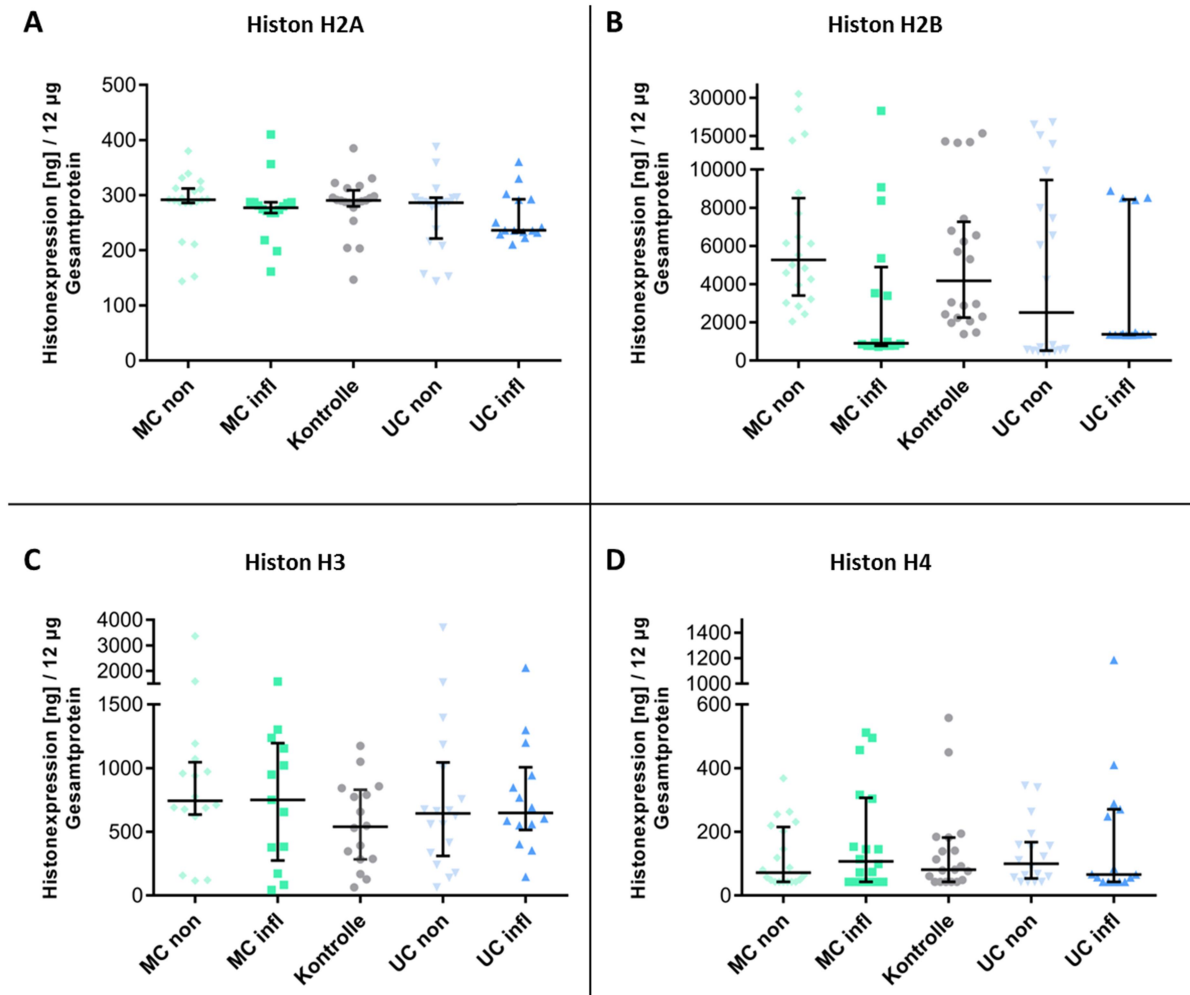


Abbildung 9 Proteinexpressionsergebnisse der Kernhistone. (A) H2A, (B) H2B, (C) H3 und (D) H4. Dargestellt sind die jeweiligen Histonzkonzentrationen in ng pro 12 µg Gesamtprotein.

3.1.4 Korrelation der mRNA- Proteinexpression

Normalerweise sind RT-PCR und Western Blots gängige Methoden zur Detektion von Mustern im Translatom bzw. Transkriptom. Um essentielle Unterschiede bei mRNA- und Proteinexpressionsdaten zu erkennen, ist allerdings eine Korrelation

nötig. Die direkte Korrelation ist in Abbildung 10 für alle vier Kernhistone dargestellt.

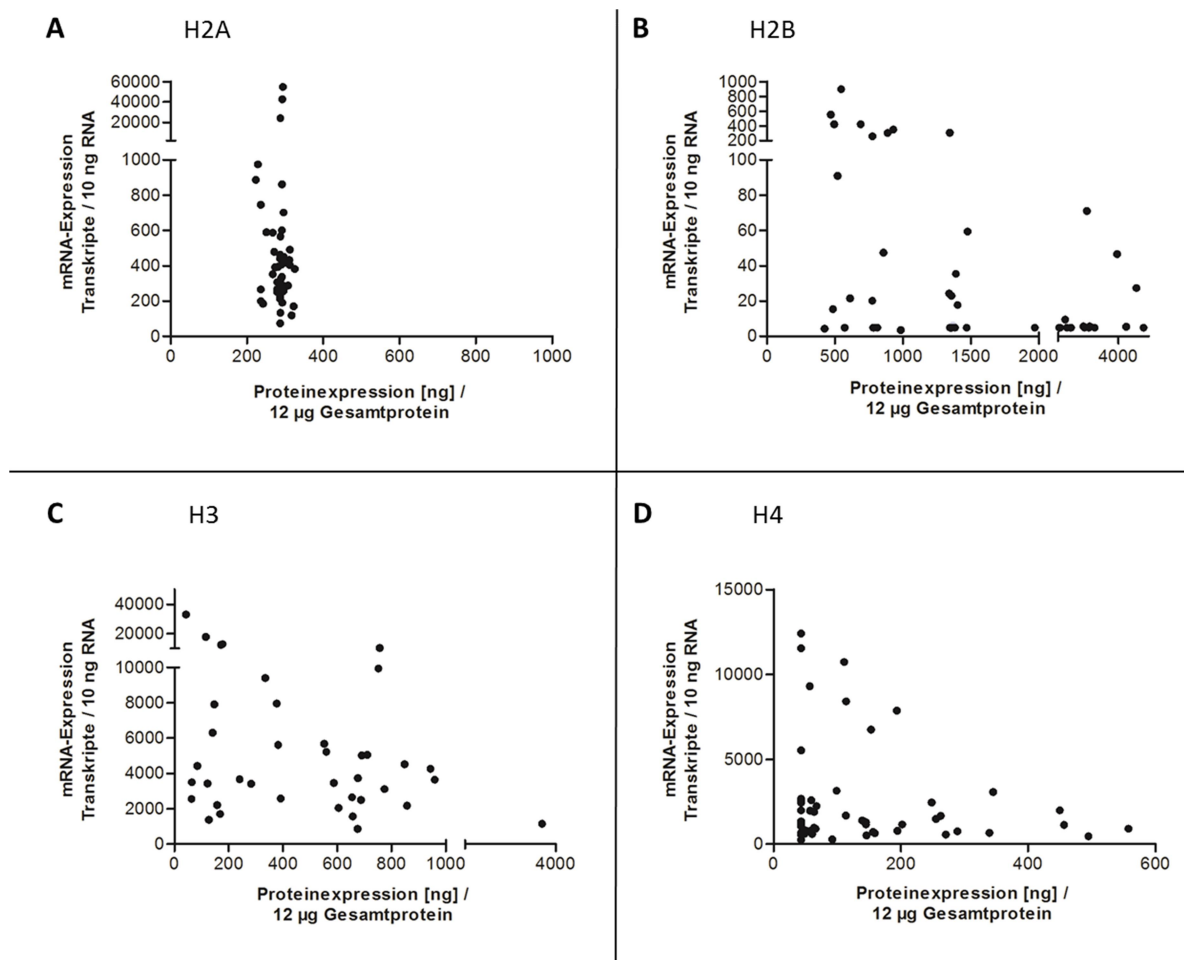


Abbildung 10 Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinexpression der vier Kernhistone H2A (A), H2B (B), H3 (C) und H4 (D) in Kolonbiopsien. Pearson-Korrelationskoeffizienten r_p : 0,08661 (H2A), -0,3549 (H2B), -0,09575 (H3) und -0,1969 (H4). P-Werte: 0,5540 (H2A), 0,0114 (H2B, *), 0,5083 (H3) und 0,1705 (H4). (* = $p < 0,05$).

Die Histonen H2A, H3 und H4 zeigten dabei keine signifikanten Korrelationen. Die statistischen Pearson-Korrelationskoeffizienten r_p lagen im Bereich zwischen 0,08661 und -0,1969 und die P-Werte zwischen 0,5540 und 0,1705, was auf keinen Zusammenhang der hier analysierten Daten schließen lässt. Bei Histon H2B zeigte sich dagegen eine leicht negative Korrelation der mRNA- und Proteinexpression mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten r_p von -0,3549. Der P-Wert von 0,0114 lässt dabei ebenfalls eine signifikante Korrelation erkennen.

3.1.5 Antimikrobielle Aktivität der Gesamtproteine aus Kolonbiopsien

Neben der Untersuchung auf mRNA- und Proteinexpression der Kernhistone, sollten die Kolonbiopsien auch auf ihre antimikrobielle Aktivität hin getestet werden. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Nuding konnte eine veränderte antimikrobielle Aktivität von Biospieextrakten gegen diverse Bakterien festgestellt werden (Nuding, et al. 2007). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde nun die Lebensfähigkeit zweier Bakterienstämmen untersucht, die zusammen mit den kationischen Kolonextrakten inkubiert wurden. Das Vitalitätsassay wurde an einem FACSCalibur *Flow Cytometer* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5.4). Dafür wurde der spannungssensitive Farbstoff [Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) Trimethine Oxonol] DiBAC₄(3) verwendet. Eine Zerstörung der bakteriellen Zellwand oder der Zelltod führt zu einer Depolarisation des Membranpotenzials, was wiederum die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs ermöglicht. Damit lässt sich die antimikrobielle Aktivität als Prozentsatz der fluoreszierenden Bakterien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmen. Untersucht wurden der gramnegative *E. coli* K12- und der grampositive *B. adolescentis*-Stamm. Beide Bakterienfamilien sind Teil der normalen Darmflora.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der kationischen Extrakte der Kolonbiopsien dargestellt, die die recht unterschiedliche antimikrobielle Aktivität gegen die beiden getesteten Spezies zeigen. Deutlich zu erkennen ist eine große Spannweite der antimikrobiellen Aktivität der einzelnen Proben innerhalb der Kontroll- und CU-Gruppen bei *E. coli* K12: Der Hauptteil der Proben zeigte eine sehr geringe Depolarisation zwischen 10 und 15 %; wenige Proben erreichten eine hohe Depolarisation von bis zu 80 %. Somit liegen die Mittelwerte der antimikrobiellen Aktivität bei den genannten Gruppen signifikant über denjenigen der Patientengruppen mit MC. Die beiden MC-Gruppen zeigten mit durchschnittlich 10 bis 15 % depolarisierten Zellen eine sehr geringe antimikrobielle Aktivität.

Bei *B. adolescentis* ist nur eine geringe Streuung der Ergebnisse zu erkennen. Eine Zweiteilung zeigt sich auch hier bei den CU-Erkrankten. Die antimikrobielle Aktivität ist bei allen Biospieextrakten sehr ähnlich; die Depolarisation liegt durchschnittlich bei 30 %.

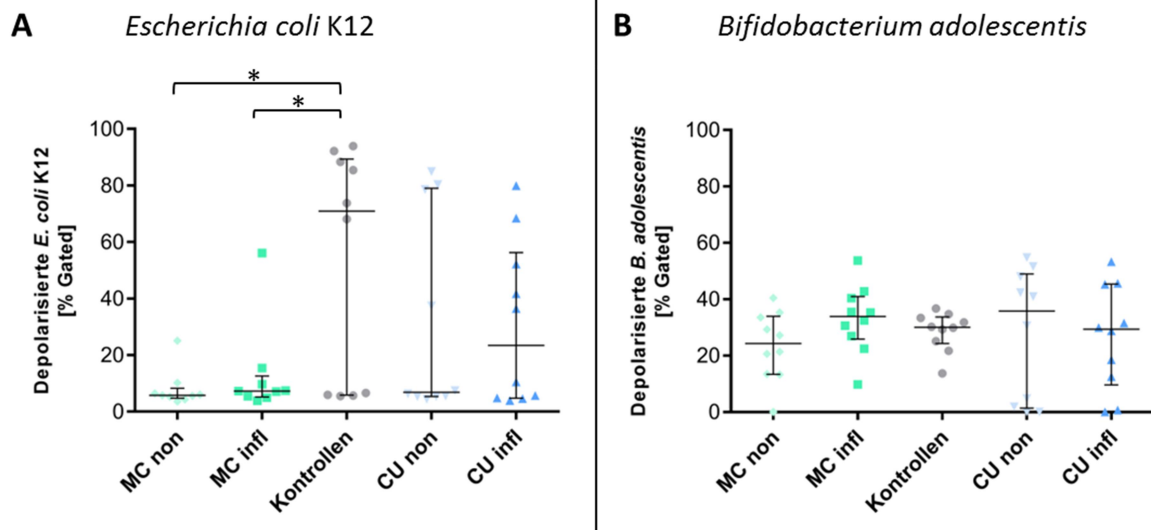


Abbildung 11 Antimikrobielle Aktivität der kationischen Biopsieextrakte von Patienten mit MC (n = 36), CU (n = 36) und Kontrollen (n = 20) gegen *E. coli* K12 (A) und *B. adolescentis* (B). Eingesetzt wurden 4 µg Gesamtprotein. (* = p < 0,05).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich qualitative Unterschiede der Zellmorphologie zu erkennen. Bei *E. coli* K12 konnten nach der Behandlung mit einigen kationischen Biopsieextrakten Veränderungen der Granularität und Zellvolumina festgestellt werden. In Abbildung 12 sind einige dieser Ergebnisse exemplarisch dargestellt. Dabei konnten in jeder Gruppe Verschiebungen der Population durch die kationischen Biopsieextrakte und unveränderte Populationen beobachtet werden.

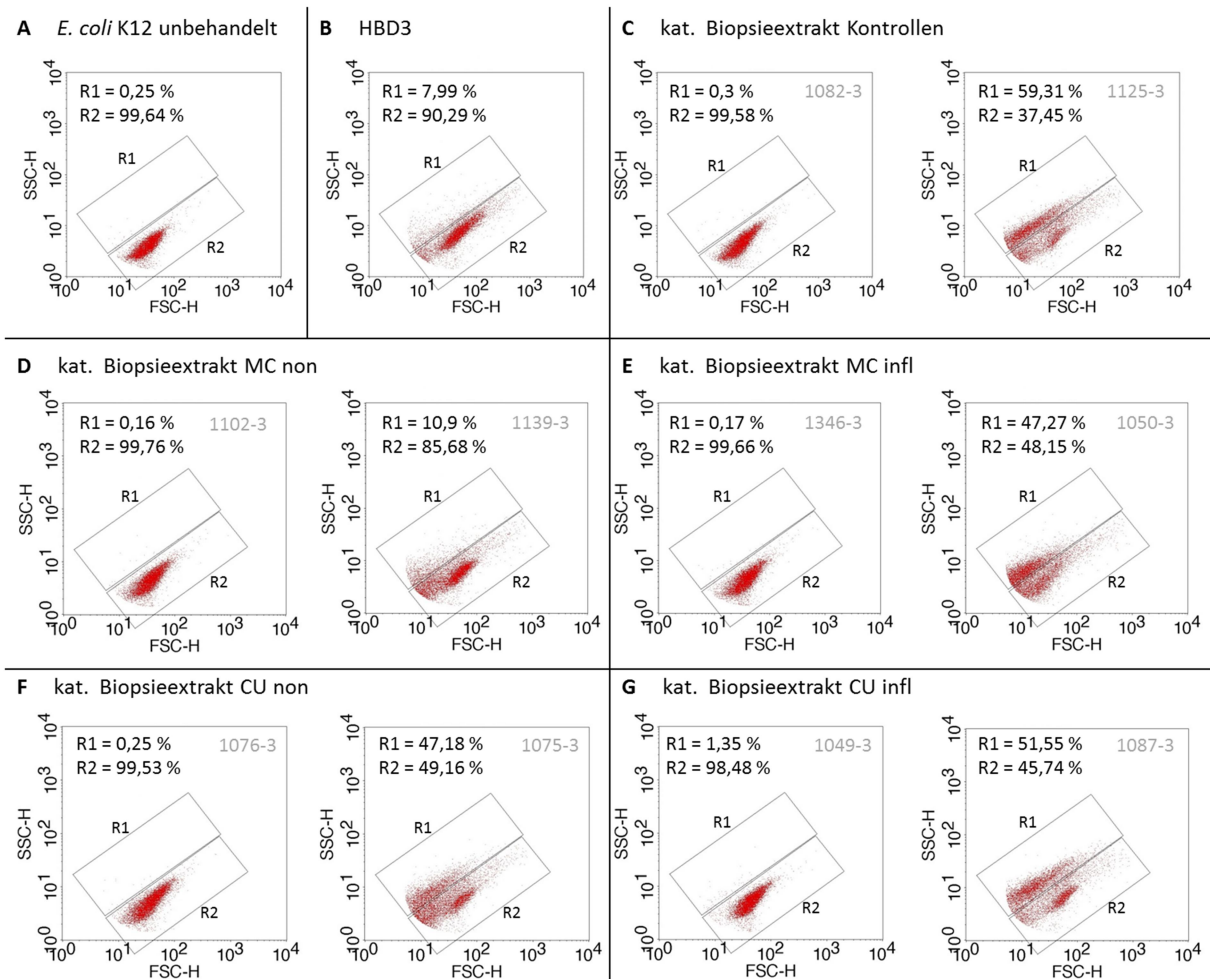


Abbildung 12 Forward Scatter-Sideward Scatter Dotplot von unbehandelten (A) und mit HBD3 (B) sowie den kationischen Biopsieextrakten (C bis G) behandelten *E. coli* K12-Zellen. Die unbehandelte Bakterienpopulation wurde durch das Gate R2 eingegrenzt. Das Gate R1 zeigt die Verschiebung der Granularität (SSC) bzw. des Volumens der Zelle (FSC).

3.2 Teil 2 – Extraktion und Analyse der Histone im Kolon

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Histone im Kolongewebe untersucht. Ziel war es bei CED-Patienten Unterschiede der antimikrobiellen Aktivität extrazellulärer Kernhistone des Kolons zu ermitteln, da solche Unterschiede als Indikatoren für Entzündungsreaktionen und Schwächung der Schutzschicht des Darms gegen Mikroorganismen interpretiert werden können. Dafür wurden Histone aus Kolonresektaten, -biopsien und Mukusabstrichen unter Verwendung eines Histonextraktionskit isoliert (siehe Kapitel 2.2.4.4). Die Histonextrakte der Resektate wurden anschließend durch eine HPLC fraktioniert (siehe Kapitel 2.2.4.5) und die erhaltenen HPLC-Fractionen per Massenanalyse mit MALDI-TOF-MS (siehe Kapitel 2.2.4.6) unter-

sucht. Die Extraktion der Histone aus menschlichem Gewebe sollte überprüft werden, um herauszufinden, ob tatsächlich nur Histone in den Histonextrakten enthalten sind. Die HPLC-Fractionen der Resektate, die Histonextrakte der Kolonbiopsien und die Histonextrakte aus dem Mukus wurden daraufhin durchflusszytometrisch auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht (siehe Kapitel 2.2.5.4.1). Bei den Mukusabstrichen wurde zusätzlich mit Hilfe von ELISAs die Proteinexpression der beiden Kernhistone H2A und H2B untersucht (siehe Kapitel 2.2.4.2). Abbildung 13 gibt einen Überblick über die in diesem Teil durchgeführten Experimente.

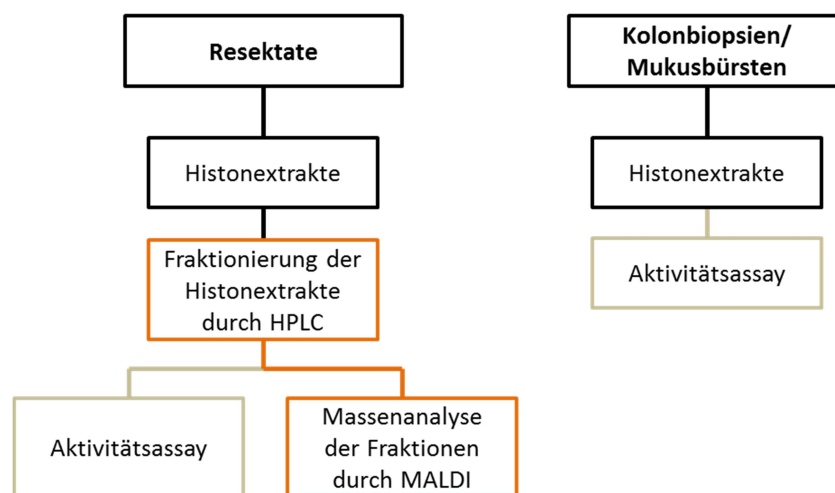


Abbildung 13 Überblick der durchgeführten Histonextraktionsversuche mit Resektaten und Kolonbiopsien. Die Histonextrakte der Resektate wurden anschließend durch HPLC fraktioniert. Die HPLC-Fractionen anschließend massenspektrometrisch untersucht (orange). Von beiden Histonextrakten wurde die antimikrobielle Aktivität untersucht (grau).

3.2.1 Extraktion und Analyse von Histonen aus Resektaten

Für die Extraktion der Histone aus Resektaten wurde das EpiSeeker Histone Extraction Kit von Abcam verwendet (siehe Kapitel 2.2.4.4). Drei dieser Histonextrakte wurden anschließend mit einer RP-HPLC in einzelne Fraktionen separiert. Ihre Peptid/Proteinprofile wurden massenspektrometrisch; ihre antimikrobielle Aktivität durchflusszytometrisch untersucht. Dabei konnte auf bereits etablierte HPLC- und MALDI-TOF-MS-Methoden nach Antoni zurückgegriffen werden (Antoni 2012).

3.2.1.1 Fraktionierung der Histonextrakte durch RP-HPLC

Drei der Histonextrakte (RM25, RM44 und RM65) wurden im Folgenden mittels RP-HPLC in einzelne Peptid/Proteinfraktionen separiert. Abbildung 14 zeigt die HPLC-Läufe der drei untersuchten Histonextrakte. Bei RM25 konnten 10, bei RM44 8 und bei RM65 sogar 12 unterschiedliche Fraktionen gesammelt werden. Die Fraktionen wurden durchnummeriert. Vergleicht man die drei Läufe, so lassen sich übereinstimmende Muster bei allen Histonextrakten erkennen, was einen Vergleich der einzelnen HPLC-Fraktionen vereinfacht.

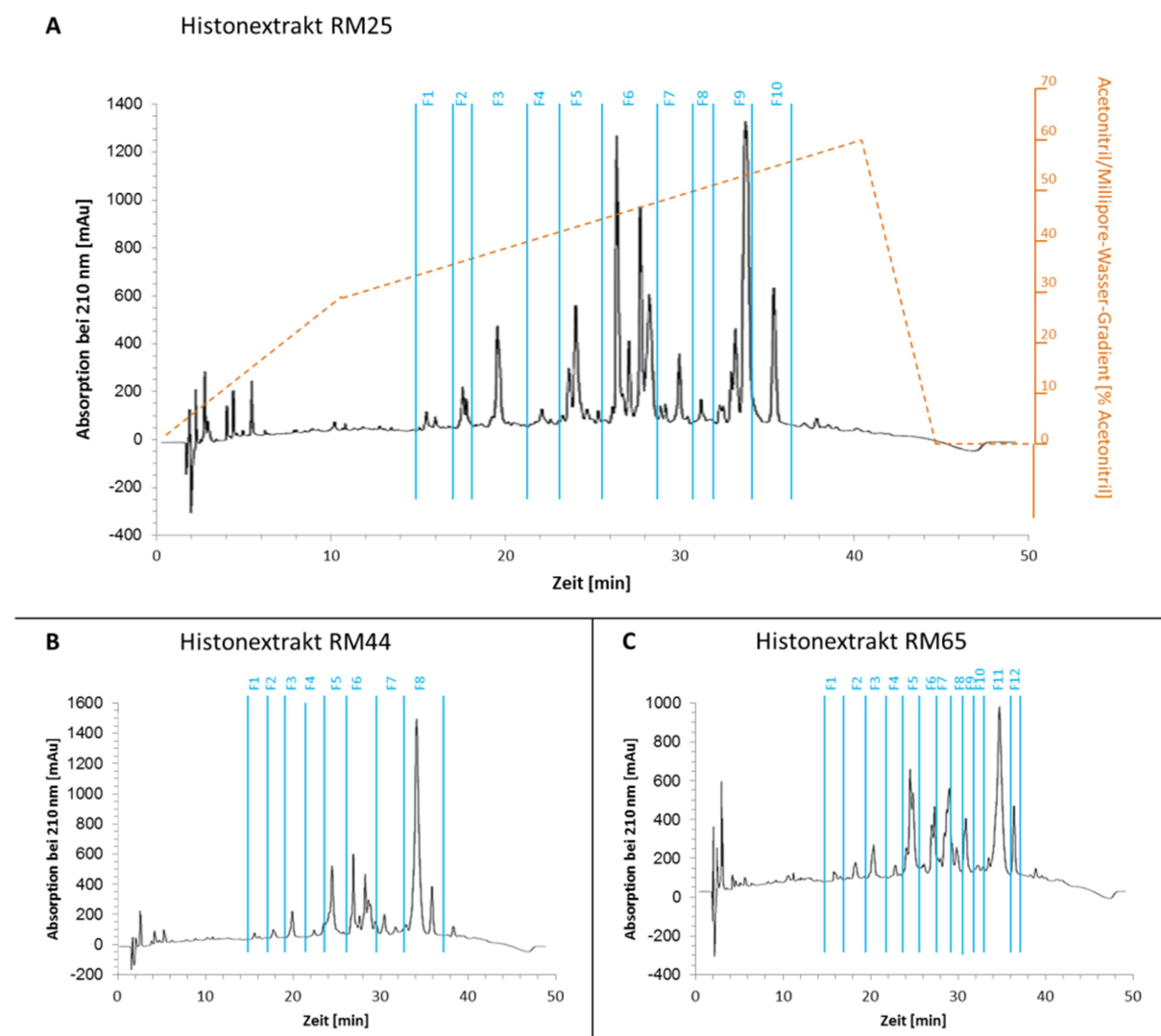


Abbildung 14 Chromatogramme der RP-HPLC-Läufe der drei Histonextrakte RM25 (A), RM44 (B) und RM65 (C) aus Resekreten. Aufgetragen wurde die Absorption bei 210 nm gegen die Zeit. Zusätzlich wurde der Verlauf des Acetonitril/Millipore-Wasser-Gradienten [% Acetonitril] exemplarisch bei RM25 (A) dargestellt. Die eingezeichneten Fraktionen (F) wurden gesammelt, lyophilisiert und in 0,01 % Essigsäure resuspendiert.

Um einen besseren Überblick über die einzelnen HPLC-Fractionen der drei Histonextrakte zu geben, wurden in Tabelle 26 die Start- und Stoppzeiten der Fraktionsentnahme aufgezeigt. Hier zeigt sich, dass die einzelnen Fraktionen größtenteils miteinander übereinstimmen. Lediglich bei RM44 Fraktion 8 konnten am Ende des HPLC-Laufs die letzten Peaks nicht voneinander getrennt werden und liegen gepoolt vor. Bei Histonextrakt RM65 wurden Fraktion 6 und 9 noch weiter separiert (siehe Tabelle 26, Histonextrakt RM65, 6 a und b; 9 a und b).

Tabelle 26 Zeiten der Fraktionierung bei der RP-HPLC der drei Histonextrakte RM25, RM44 und RM65. Aufgezeigt sind die Start- und Stoppzeiten in min der einzelnen HPLC-Fractionen.

Fraktion	RM25		RM44		RM65	
	Start [min]	Stopp [min]	Start [min]	Stopp [min]	Start [min]	Stopp [min]
1	15,65	15,98	15,66	16,65	15,65	16,80
2	17,69	18,46	17,94	18,82	17,94	18,89
3	19,65	20,44	19,89	20,77	19,98	20,90
4	22,30	22,81	22,64	23,12	22,61	23,55
5	23,86	25,27	23,76	25,82	23,94	25,99
6	26,42	29,18	26,87	29,55	a 26,81 b 28,35	27,42 29,82
7	30,12	30,81	30,59	31,50	29,88	30,50
8	31,55	32,02	32,06	36,59	30,63	31,64
9	32,65	35,33	*/	*/	a 32,16 b 33,47	33,29 34,98
10	35,67	36,88	*/	*/	36,27	37,28

* Bei HPLC-Fraktion 8 des Histonextrakts RM44 wurden die letzten Peaks nicht voneinander getrennt. Mit a und b wurden Fraktionen gekennzeichnet, die bei Histonextrakt RM65 zusätzlich separiert wurden.

3.2.1.2 Massenspektrometrie der HPLC-Fractionen

Durch die Histonextraktion der Resektate sollten alle Histone aus menschlichem Gewebe isoliert werden. Die Peptide/Proteine wurden mit RP-HPLC fraktioniert und mittels Massenspektrometrie untersucht, um zu überprüfen, ob tatsächlich nur Histone und keine anderen antimikrobiell aktiven Peptide in den Histonextrakten enthalten sind. Um die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 in den HPLC-Fractionen zu detektieren, wurden die rekombinanten Kernhistone massenspektrometrisch untersucht und deren Massen mit den theoretischen Massen verglichen (siehe Abbildung 15 und Tabelle 27).

Vergleicht man die durch MALDI-TOF-MS detektierten molekularen Massen der Kernhistone mit den theoretischen Werten, lässt sich erkennen, dass diese nahezu übereinstimmen. Lediglich bei Histon H3 konnte eine leichte Massenabweichung detektiert werden (siehe Tabelle 27). Bei allen rekombinanten Histonen sind zusätzliche Peaks auf Höhe der halben erwarteten Masse zu erkennen. Diese Peaks kennzeichnen doppelt geladene Ionen, da die Massentrennung nach dem Masse/Ladungsverhältnis erfolgt.

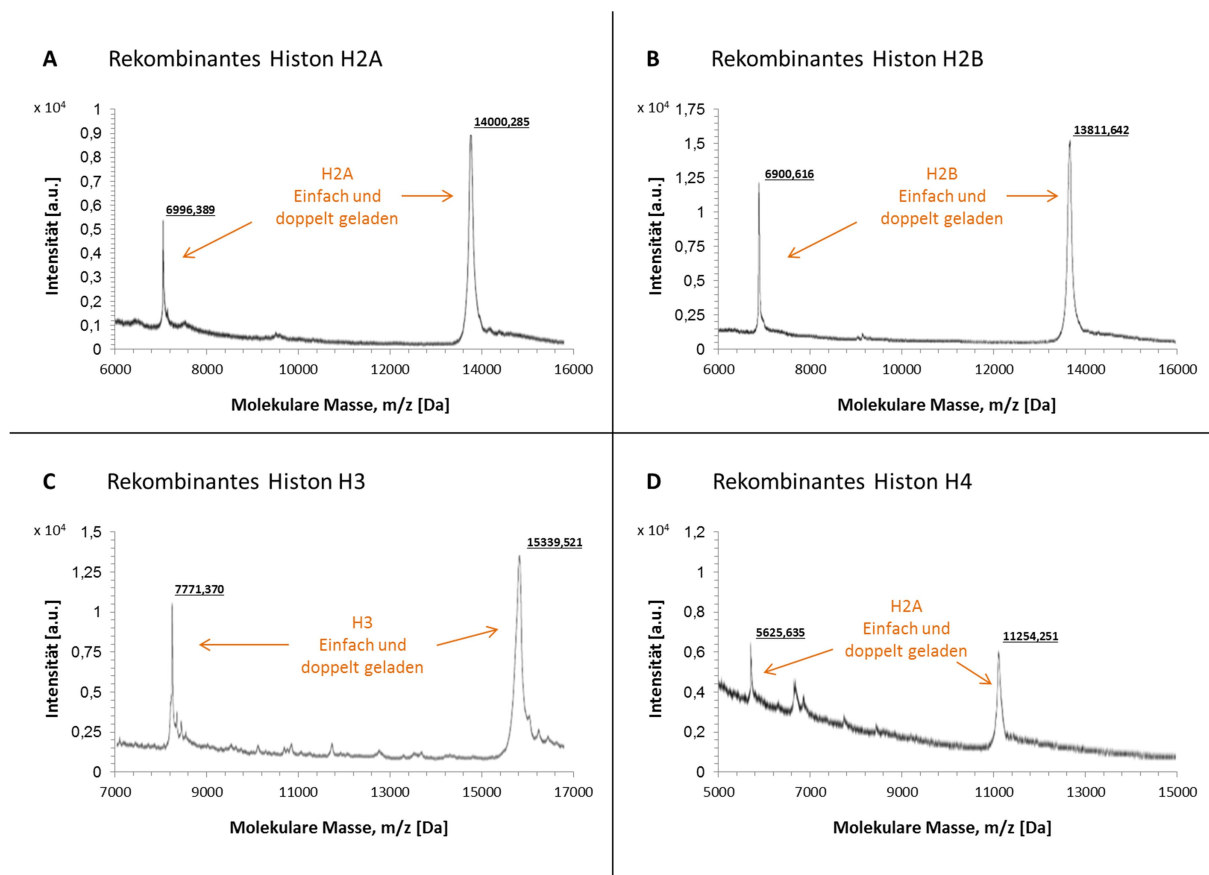


Abbildung 15 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten molekularen Massen der rekombinanten Kernhistone H2A (A), H2B (B), H3 (C) und H4 (D). Aufgetragen wurden die jeweiligen m/z-Werte gegen die relative Intensität. Neben den erwarteten Massen sind bei jedem rekombinanten Histon ebenfalls Peaks auf Höhe der halben molekularen Masse zu erkennen. Diese Peaks zeigen die einfach und doppelt geladenen Ionen nach dem Masse/Ladungsverhältnis.

Tabelle 27: Vergleich der durch MALDI-TOF-MS detektierten und theoretischen molekularen Massen der Kernhistone.

Kernhiston	Detektierte Masse [kDa]	Theoretische Masse [kDa]
H2A	6,996 / 14,000	14,019
H2B	6,900 / 13,811	13,805
H3	7,771 / 15,339	15,196
H4	5,625 / 11,254	11,236

Im Anschluss wurden die HPLC-Fractionen auf Kernhistone und andere eventuell vorkommende antimikrobielle Peptide gescreent. Dabei konnten die gesuchten Massen in verschiedenen HPLC-Fractionen der Histonextrakte detektiert werden. In Histoneextrakt RM25 konnten alle vier Kernhistone nachgewiesen werden: H2A (14,021 kDa) und H2B (13,793 kDa) in Fraktion 6; H3 (15,154-15,349 kDa) in den Fraktionen 7, 9 und 10 sowie H4 (11,260 kDa) in Fraktion 2 (siehe Abbildung 16).

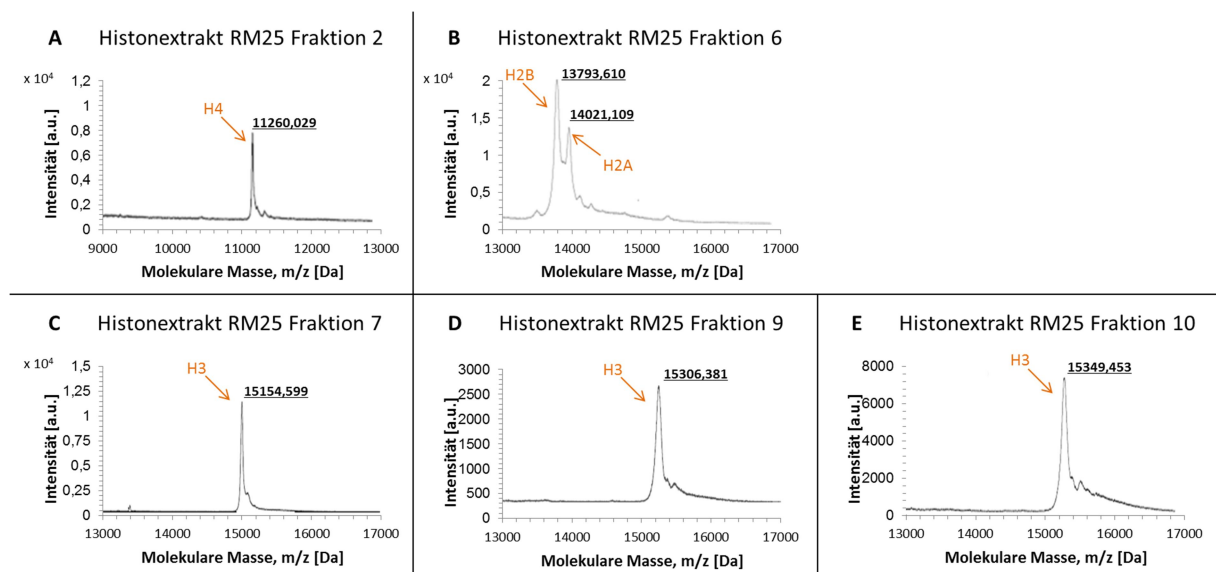


Abbildung 16 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten molekularen Massen der Kernhistone im Histoneextrakt RM25 der HPLC-Fractionen 2 (A), 6 (B), 7 (C), 9 (D) und 10 (E). Aufgetragen wurden die jeweiligen m/z-Werte gegen die relative Intensität.

In Histoneextrakt RM44 konnten ebenfalls alle vier Kernhistone nachgewiesen werden: H2A (14,017 kDa) und H2B (13,795 kDa) in Fraktion 6; H3 (15,320 kDa) in Fraktion 8 sowie H4 (11,259 kDa) in Fraktion 2 (siehe Abbildung 17).

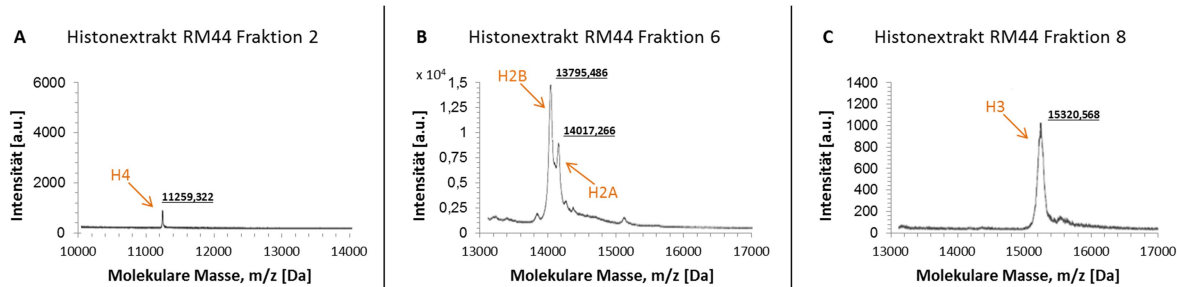


Abbildung 17 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierte molekulare Massen der Kernhistone im Histonextrakt RM44 der HPLC-Fractionen 2 (A), 6 (B) und 8 (C). Aufgetragen wurden die jeweiligen m/z-Werte gegen die relative Intensität.

In Histonextrakt RM65 konnten die vier Kernhistone ebenfalls nachgewiesen werden: H2A (14,024 kDa) in Fraktion 6b; H2B (13,801 kDa) in Fraktion 6a; H3 (15,153-15,356 kDa) in Fraktion 8, 9b und 10 sowie H4 (11,258 kDa) in Fraktion 2 (siehe Abbildung 18). Im Gegensatz zu den beiden anderen Histonextrakten war es hier möglich, die beiden Histone H2A und H2B voneinander zu trennen.

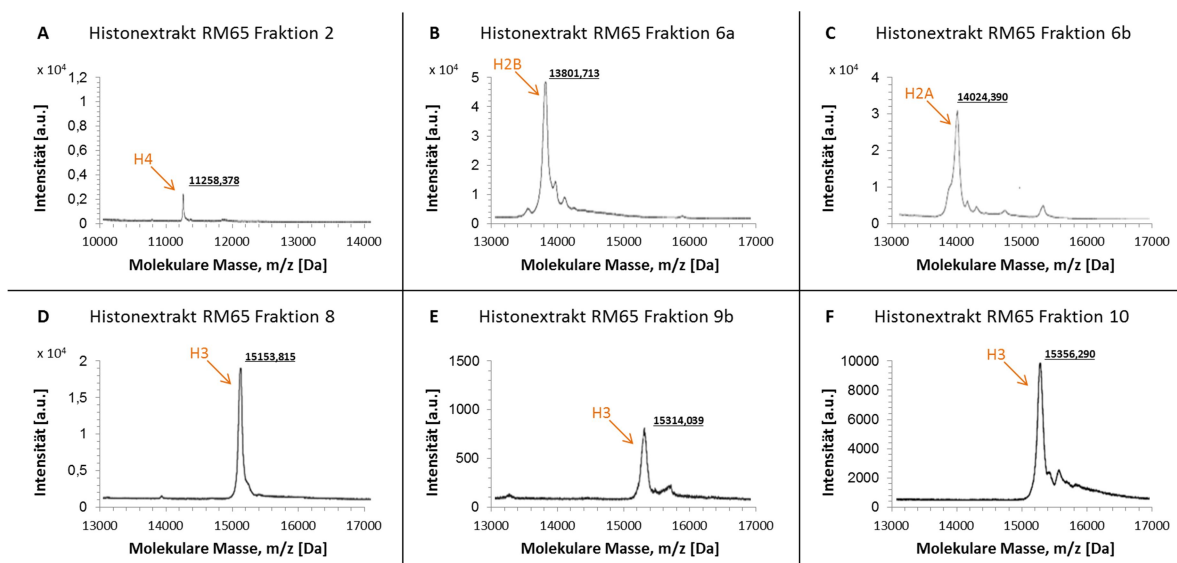


Abbildung 18 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierte molekulare Massen der Kernhistone im Histonextrakt RM65 der HPLC-Fractionen 2 (A), 6a (B), 6b (C), 8 (D), 9b (E) und 10 (F). Aufgetragen wurden die jeweiligen m/z-Werte gegen die relative Intensität.

Neben den relativen Molekülmassen, die sich (mit ziemlicher Sicherheit) den Kernhistonen zuordnen lassen, konnten in anderen HPLC-Fractionen auch unbekannte Peptide/Proteine festgestellt werden: Histonextrakt RM25 Fraktion 3; RM44 Fraktio-

nen 1 und 3 und RM65 Fraktionen 1 und 5. In Abbildung 19 sind die MALDI-TOF-MS-Ergebnisse dieser unbekannt Proteine exemplarisch dargestellt.

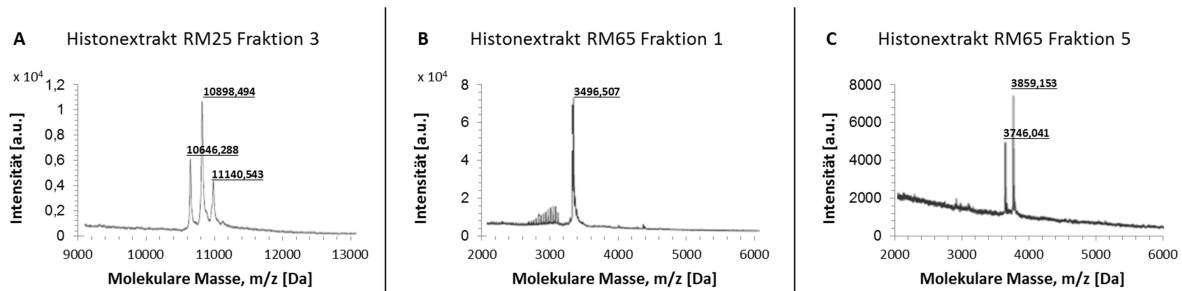


Abbildung 19 Graphische Darstellung der durch MALDI-TOF-MS identifizierten molekularen Massen unbekannter Peptide/Proteine in Histoneextrakt RM25 Fraktion 3 (A), Histoneextrakt RM65 Fraktion 1 (B) und Fraktion 5 (C). Aufgetragen wurden die jeweiligen m/z-Werte gegen die relative Intensität.

Die Zusammenstellung in Tabelle 28 zeigt, dass die detektierten molekularen Massen der unbekannt Proteine in Histoneextrakt RM25 und RM44 der Fraktion 3 weitestgehend übereinstimmen. Die restlichen gemessenen Massen liegen im Bereich von 3,171 und 3,859 kDa. Die molekularen Massen entsprechen nicht den klassischen AMPs. Vermutlich handelt es sich dabei um modifizierte oder fragmentierte Histone.

Tabelle 28: Zusammenstellung der durch MALDI-TOF-MS detektierten molekularen Massen unbekannter Peptide/Proteine.

Histoneextrakt	Fraktion 1 Masse [Da]	Fraktion 3 Masse [Da]	Fraktion 4 Masse [Da]	Fraktion 5 Masse [Da]
RM25	*/	10646,288 10898,494 11140,549	*/	*/
RM44	3171,757	10647,737 10898,902 11141,349	*/	*/
RM65	3496,507	*/	*/	3746,041 3859,153

* keine detektierten molekularen Massen durch MALDI-TOF-MS.

3.2.1.3 Antimikrobielle Aktivität der HPLC-Fractionen von Histonextrakten

Die antimikrobielle Aktivität der HPLC-Fractionen der Histonextrakte RM25, RM44 und RM65 aus den Resektaten wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Vitalitätstests gegen den gramnegativen Stamm *E. coli* K12 getestet (siehe Abbildung 20).

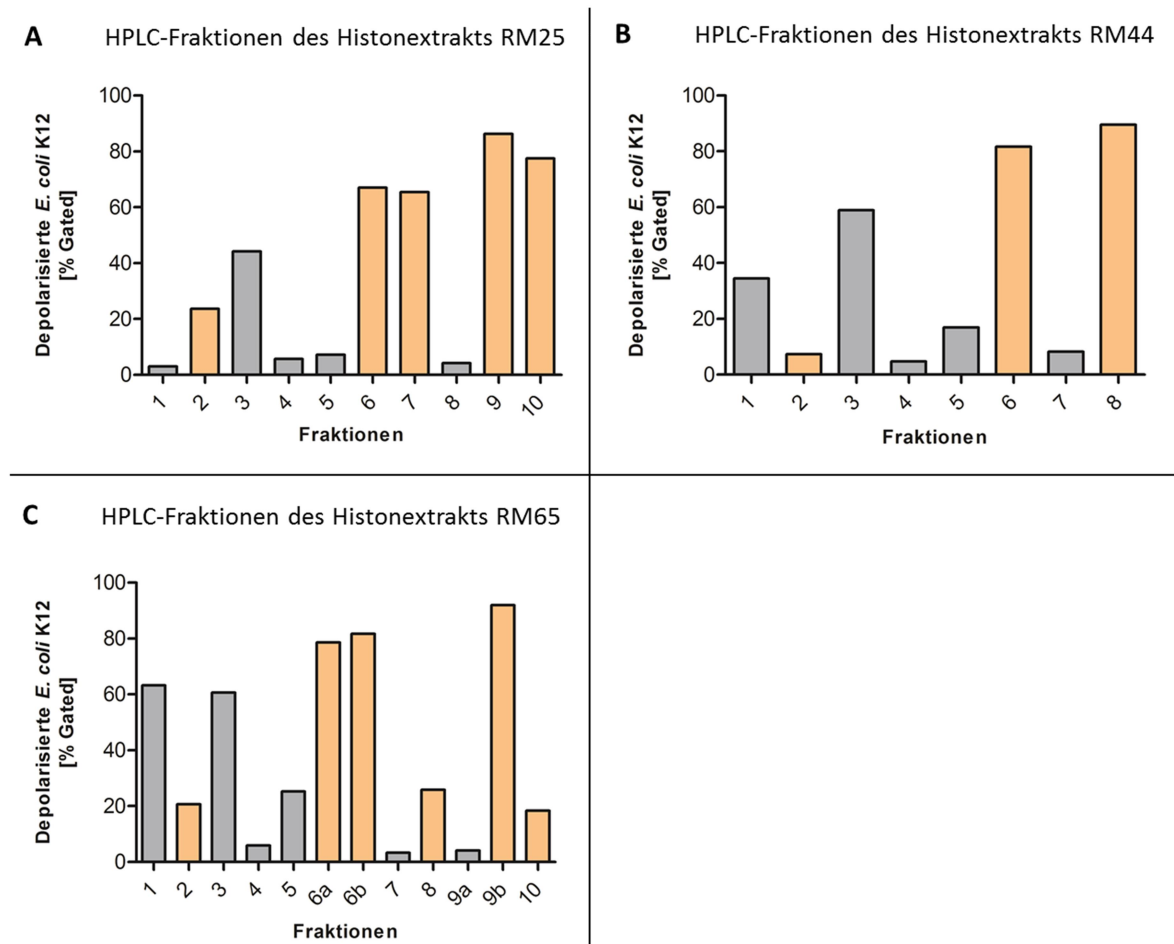


Abbildung 20 Antimikrobielle Aktivität der RP-HPLC-Fractionen der Histonextrakte RM25 (A), RM44 (B) und RM65 (C) gegen *E. coli* K12. Alle Fraktionen wurden zuvor im gleichen Volumen aufgenommen. Für diesen Versuch wurden jeweils 3 μ l der Gesamtextrakte eingesetzt. Orange hervorgehoben wurden die Fraktionen mit den massenspektrometrisch detektierten Kernhistonen; grau, die Fraktionen mit noch unbekanntem Proteinen/Peptiden.

Wie anhand der massenspektrometrischen Daten erkennbar ist (siehe Kapitel 3.2.1.2), konnten in den Fraktionen 2, 6, 7, 9 und 10 bei allen Histonextrakten die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 detektiert werden. Alle Fraktionen bis auf Fraktion 2 zeigten auch im durchflusszytometrischen Vitalitätstest eine starke bakterizide Wirkung. Vor allem die Fraktion 6 und 7 mit den enthaltenen Histonen H2A und H2B und die Fraktionen 8 bis 10 mit dem enthaltenen Histon H3 waren stark antimikrobiell aktiv

(über 80 % depolarisierte *E. coli* K12). Fraktion 2 mit dem darin befindlichen Histon H4 zeigte dagegen nur eine schwache bakterizide Wirkung mit maximal 20 % depolarisierten *E. coli* K12. In den restlichen Fraktionen konnten mit Hilfe des MALDI-TOF-MS keine Histone detektiert werden. Jedoch sind die in diesen Fraktionen enthaltenen unbekanntem Peptide/Proteine in einigen Fällen antimikrobiell aktiv. Vergleicht man die Ergebnisse des Vitalitätstests mit denen durch MALDI-TOF-MS detektierten unbekanntem Massen (siehe Tabelle 28) lässt sich nachweisen, dass die enthaltenen Proteine in HPLC-Fraktion 3 (bei Histonextrakt RM25 und RM44) und Fraktion 1 (bei RM65) starke bakterizide Wirkung besitzen (40 bis 60 % depolarisierte *E. coli* K12). Auch die kleineren Proteine in Fraktion 1 (bei RM44) und Fraktion 5 (bei RM65) zeigen eine leichte antimikrobielle Aktivität (20 bis 30 % depolarisierte Bakterien).

3.2.2 Immunhistologische Betrachtung von Histonen in der Kolonmukosa

In einem weiteren Schritt wurden Vorkommen und Lage extrazellulärer Histone mit Hilfe von histologischen Färbungen veranschaulicht. Aufgrund der starken Desquamation von Darmepithelzellen ist eine Anlagerung der Histone im Mukus zu vermuten. Verwendet wurden hierfür Schnitte von Carnoy-fixierten Kolonresektaten von Patienten mit MC sowie die in Tabelle 21 aufgelisteten Primärantikörper. In Abbildung 21 ist die Identifizierung der Kernhistone H2B, H3 und H4 in Mukus und Mukosa dargestellt.

Die Gewebefärbungen zeigen deutlich die Lage der Histone in der Mukosa. Wie zu erwarten, sind die meisten Nuclei der Zellen stark gefärbt. Auch die Retention der Histone im Mukus konnte durch eine deutliche Braunfärbung gezeigt werden. Die Histone H3 und H4 sind stark im Mukus vertreten. Bei H2B fällt die Färbung (möglicherweise antikörperbedingt) schwächer aus. Lediglich im Bereich zwischen den einzelnen Mikrovilli sind leicht gefärbte Bereiche erkennbar. Die Färbungen der Gewebeschnitte von H2A können nicht für eine Auswertung herangezogen werden, da kein passender Primärantikörper gefunden werden konnte und die getesteten Antikörper zu keiner Farbreaktion führten.

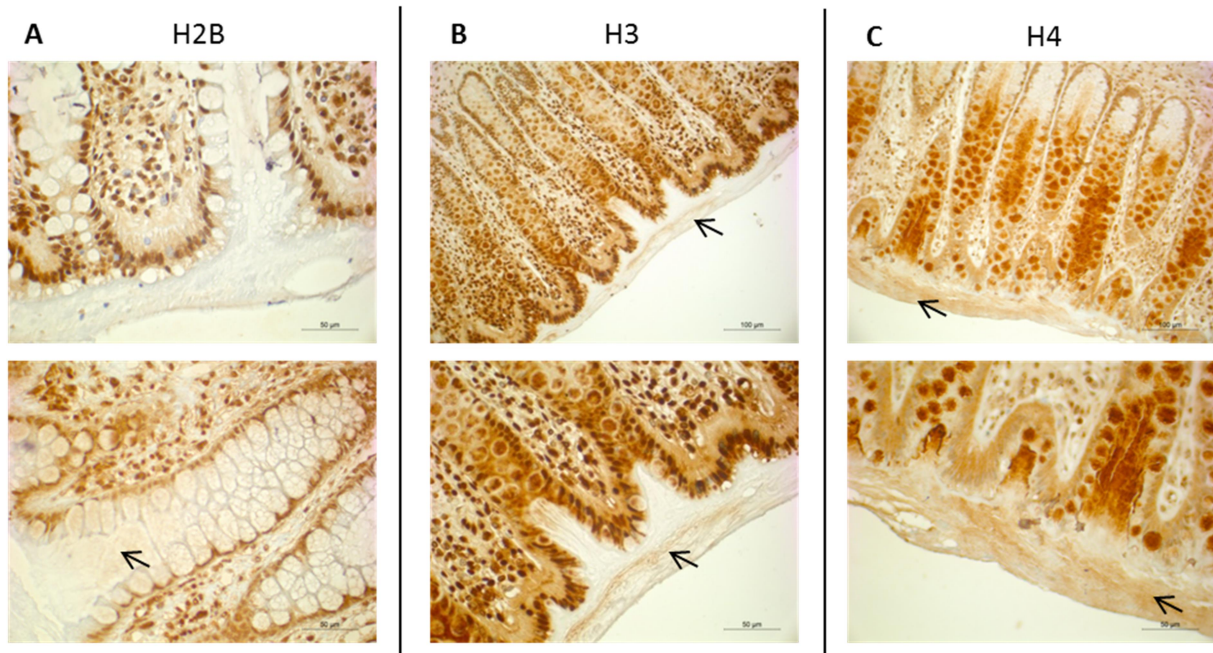


Abbildung 21 Immunhistologische Identifizierung der Kernhistone H2B (A), H3 (B) und H4 (C) in Mukus und Mukosa des Kolons. Der gefärbte Mukus wurde durch Pfeile gekennzeichnet. Zur Erhaltung des Mukus wurden Gewebeschnitte von Carnoy-fixierten Kolonresektaten verwendet.

3.2.3 Extraktion und Analyse von Histonen aus Kolonbiopsien

Für die Histonextraktion aus 42 weiteren Kolonbiopsien wurde ebenfalls das EpiSeecker Histone Extraction Kit von Abcam verwendet (siehe Kapitel 2.2.4.4). Bei der Aufarbeitung der Proben wurden die Mengen der verwendeten Lysate auf eine durchschnittliche Biopsiegröße von 10 mg angepasst. Die Kolonbiopsien wurden ebenfalls von der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Robert-Bosch-Krankenhauses, Stuttgart, während einer Koloskopie entnommen. Die Biopsien wurden in fünf Gruppen eingeteilt: Gesunde Kontrollen (n = 10), MC entzündet (n = 6), MC nicht entzündet (n = 10), CU entzündet (n = 6) und CU nicht entzündet (n = 10). Die Histonextrakte wurden anschließend mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Vitalitätstests auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht. Diese Arbeiten fanden in den Alb Fils Kliniken in Göppingen statt.

Abbildung 22 zeigt die konzentrationsabhängige bakterizide Wirkung der Histonextrakte aus Kolonbiopsien gegen das gramnegative Bakterium *E. coli* ATCC 25922 und das grampositive Bakterium *S. aureus* ATCC 25923. Die Histonextrakte aus Kolonbiopsien lassen bei *E. coli* ATCC 25922 durchschnittlich eine Depolarisation um die

40 % erkennen; bei *S. aureus* ATCC 25923 war die Depolarisation mit um die 50 % geringfügig höher. Vergleicht man die Ergebnisse der entzündeten und nicht entzündeten Gruppen miteinander, lässt sich bei den beiden getesteten Bakterienstämmen eine höhere antimikrobielle Aktivität der Histonextrakte von Patienten mit MC infl und CU infl erkennen. Bei den Kontrollgruppen wichen die Ergebnisse deutlich ab: Während bei *E. coli* ATCC 25922 die Depolarisation der Kontrollen mit durchschnittlich 30 % den niedrigsten gemessenen Wert zeigte, konnte bei den Kontrollen gegen *S. aureus* ATCC 25923 mit einer Depolarisation von um die 60 % der höchste Wert gemessen werden. Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen der getesteten Mikroorganismen konnten dagegen nicht beobachtet werden.

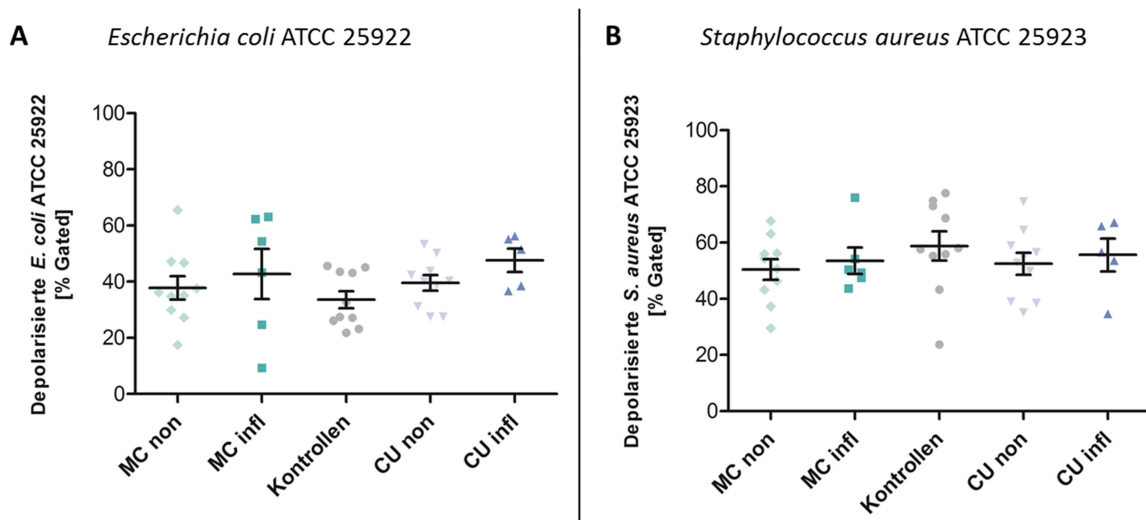


Abbildung 22 Aktivität der Histonextrakte aus Kolonbiopsien gegen *E. coli* ATCC 25922 (A) und *S. aureus* ATCC 25923 (B). Eingesetzt wurde eine Konzentration von 4 µg Histonextrakt.

Abbildung 23 zeigt ebenfalls die bakterizide Wirkung der Histonextrakte aus Kolonbiopsien gegen das gramnegative Bakterium *E. coli* ATCC 25922 und das grampositive Bakterium *S. aureus* ATCC 25923. Zusätzlich wurde die Wirkung gegen das gramnegative, obligat anaerobe Bakterium *B. vulgatus* ATCC 8482 und gegen die Hefe *C. albicans* 562 getestet. Für einen besseren Vergleich wurde in diesem Fall eine Volumenabhängigkeit dargestellt. Eingesetzt wurden jeweils 2 µl Histonextrakt. Bei diesen Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der einzelnen Patientengruppen gegen die drei Stämme *E. coli* ATCC 25922, *B. vulgatus*

ATCC 8482 und *C. albicans* 526. Lediglich bei der durchschnittlichen Wirkung gegen diese Stämme ist eine Abweichung zu erkennen. Die höchste antimikrobielle Wirkung mit durchschnittlich 50 bis 60 % depolarisierten Bakterien konnte gegen *B. vulgatus* ATCC 8482 gemessen werden. Mit ca. 30 bis 40 % depolarisierten Zellen wiesen die Histonextrakte eine deutlich geringere antimikrobielle Aktivität gegen die beiden Stämme *E. coli* ATCC 25922 und *C. albicans* 526 auf.

Die einzige Abweichung ist bei *S. aureus* ATCC 25923 zu erkennen. Die antimikrobielle Aktivität innerhalb der Patientengruppen zeigten bei *S. aureus* ATCC 25923 deutliche Unterschiede, die in zwei Fällen signifikant waren. Die höchste Depolarisation konnte bei CU-Patienten, mit durchschnittlich 70 % bei CU infl und 50 % bei CU non, gemessen werden. Eine vergleichbare antimikrobielle Aktivität konnte bei MC infl mit 50 % depolarisierte *S. aureus* ATCC 25923 gemessen werden. Die niedrigsten Werte wurden bei MC non und den Kontrollpatienten (ca. 30 % depolarisierte Zellen) gemessen.

Aufgrund der deutlichen Abweichung der *S. aureus* ATCC 25923-Ergebnisse wurde ein weiterer *S. aureus* Stamm zur Untersuchung herangezogen, das Patientenisolat 375 (siehe Abbildung 23 E). Auch bei diesem *S. aureus* Stamm ließ sich dasselbe Muster innerhalb der einzelnen Gruppen erkennen, wenn auch mit geringerer Gesamtkaktivität. Die höchsten Werte zeigten ebenfalls die CU infl Patienten mit durchschnittlich 50 % depolarisierter Zellen. Geringere antimikrobielle Aktivitäten konnten bei MC infl und CU non (40 % Depolarisation) gemessen werden. Die niedrigsten Werte wurden wiederum bei MC non und den Kontrollen gemessen (beide um die 30 % depolarisierte Bakterien).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die antimikrobielle Aktivität der Histonextrakte vom getesteten Stamm abhängt. Es darf also von einer speziesspezifischen Wirkung ausgegangen werden.

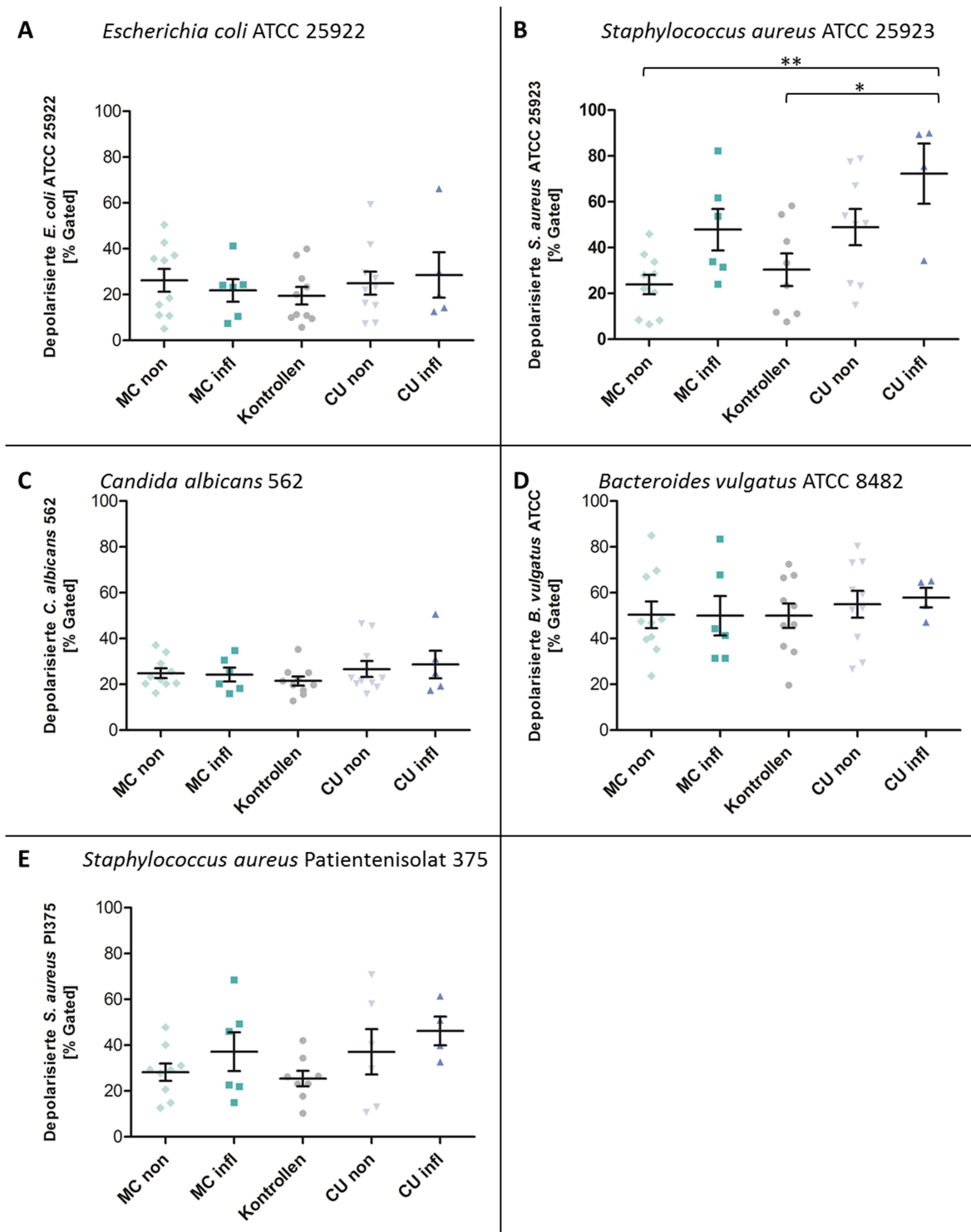


Abbildung 23 Aktivität der Histonextrakte aus Kolonbiopsien gegen *E. coli* ATCC 25922 (A), *S. aureus* ATCC 25923 (B), *C. albicans* 562 (C), *B. vulgatus* ATCC 8482 (D) und das Patientenisolat *S. aureus* PI375 (E). Eingesetzt wurde ein Volumen von 2 µl Histonextrakt.

3.2.4 Extraktion und Analyse von Histonen aus Mukusbürsten

Aus Mukusabstrichen wurden ebenfalls Histone isoliert und analysiert. Die Mukusabstriche wurden mittels einer Bürste von der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart, während einer Endoskopie entnommen. Die Proben wurden in drei Gruppen eingeteilt: Gesunde Kontrollen (n = 7), MC- (n = 12) und CU-Patienten (n = 12), wobei nicht zwischen entzündet und nicht entzündet unterschieden wurde. Der abgestreifte Mukus wurde gewogen und die Histone isoliert. Auch hierfür wurde das EpiSeeker Histone Extraction Kit von Abcam verwendet (siehe Kapitel 2.2.4.4). Aufgrund des sehr geringen Mukusvolumens wurden lediglich die beiden Kernhistone H2A und H2B mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert und anschließend die antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* ATCC 25922 und *S. aureus* ATCC 25923 bestimmt. Die beiden ELISA-Tests wurden nach Herstellerangaben verwendet. Eingesetzt wurden jeweils 5 µl Mukus. Anschließend wurde das vorher gewogene totale Mukusvolumen verrechnet und die relative Histonzkonzentrationen ermittelt (siehe Abbildung 24).

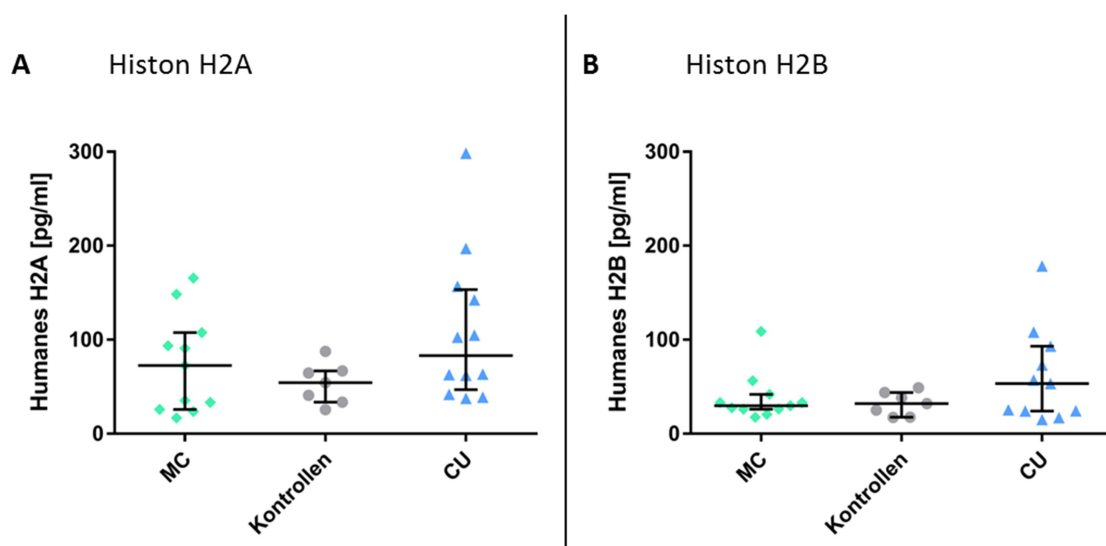


Abbildung 24 Konzentration der Kernhistone H2A (A) und H2B (B) aus Mukusabstrichen. Der Mukus wurde mit Hilfe einer Bürste abgestreift, gewogen und anschließend die Histone isoliert. Von jedem Patient wurde die gleiche Menge Mukus eingesetzt (5 µl) und mit dem vorher gewogenen totalen Mukusvolumen verrechnet, so dass die relativen Histonzkonzentrationen in der Graphik aufgetragen wurden. Eingeteilt wurden die Patienten in drei Gruppen: Kontrollen, Patienten mit MC und CU.

Die Ergebnisse der beiden ELISA-Tests zeigten eine vergleichbare Tendenz hinsichtlich ihrer jeweiligen Histonkonzentration: Mit durchschnittlich 50 pg/ml H2A und 30 pg/ml H2B lagen die Werte bei den Kontrollpatienten im unteren Bereich. Etwas höher zeigten sich die Konzentrationen bei MC-Patienten mit etwa 75 pg/ml H2A und 50 pg/ml H2B. Mit durchschnittlich 110 pg/ml H2A und 75 pg/ml H2B lagen die Histonkonzentrationen bei Patienten mit CU am höchsten. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen konnten hierbei nicht festgestellt werden.

In einem weiteren Schritt wurde die antimikrobielle Aktivität der Histonextrakte aus den Mukusabstrichen durchflusszytometrisch getestet (siehe Abbildung 25). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Bei *E. coli* ATCC 25922 lag die durchschnittliche Aktivität der Kontrollen bei 30 % depolarisierter Zellen. Die beiden anderen Gruppen lagen mit durchschnittlichen Werten von 35 % (MC-Patienten) und 40 % depolarisierten *E. coli* (CU-Patienten) leicht höher. Jedoch scheinen diese Unterschiede aufgrund der hohen Streuung innerhalb der beiden CED-Gruppen vernachlässigbar. Bei *S. aureus* ATCC 25923 zeigten sich weit weniger Unterschiede zwischen den getesteten Gruppen. Insgesamt lag die durchschnittliche antimikrobielle Aktivität viel höher als bei *E. coli* ATCC 25922 (über 80 % depolarisierte Bakterien).

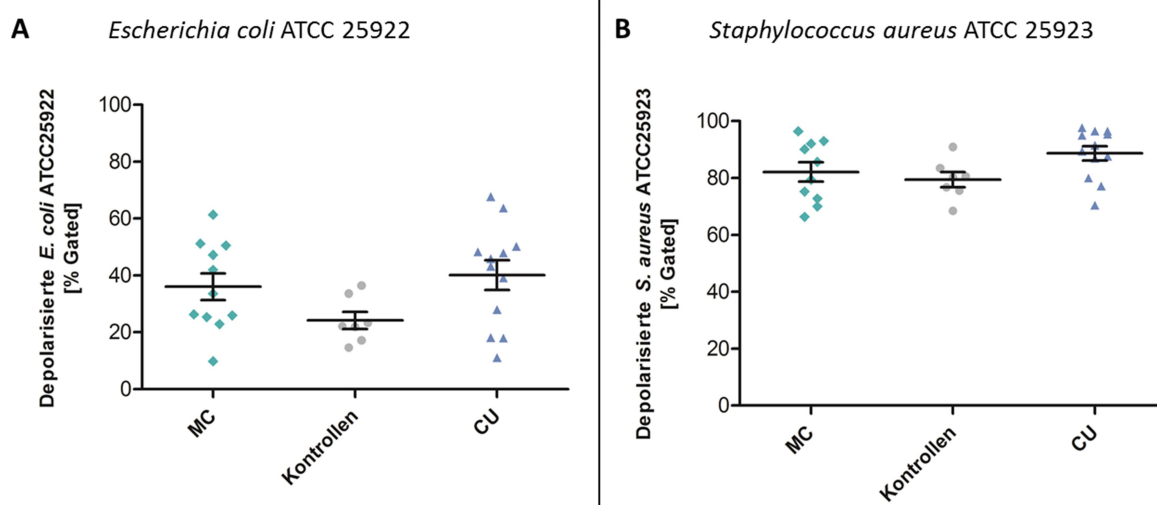


Abbildung 25 Antimikrobielle Aktivität der Histonextrakte aus Mukusabstrichen gegen *E. coli* ATCC 25922 (A) und *S. aureus* ATCC 25923 (B). Eingesetzt wurde von jeder Probe ein Volumen von 3 µl.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bakterizide Wirkung der Histone extrakte aus Mukusabstrichen ebenfalls speziesspezifisch ist. Es konnten keine Unterschiede zwischen Erkrankungen und gesunden Kontrollen festgestellt werden.

3.3 Teil 3 – Antimikrobielle Aktivität rekombinanter Histone

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Aktivität rekombinanter Histone gegen die verschiedensten Mikroorganismen untersucht. Hierfür wurden Vertreter der intestinalen Mikrobiota ausgewählt, wie beispielweise das gramnegative Bakterium *E. coli*, das grampositive Bakterium *S. aureus*, die anaeroben Bakterienstämme *B. vulgatus* und *B. fragilis* sowie der Hefepilz *C. albicans*. Daneben wurde auch die antimikrobielle Wirkung gegen den nosokomialen Erreger *C. difficile* getestet. Durch Kombination von Histonen untereinander bzw. mit Defensinen konnten ebenfalls synergistische Effekte beobachtet werden.

3.3.1 Synergismusstudie

Der synergistische Effekt von Histonkombinationen wurde mit einem Vitalitätstest durchflusszytometrisch untersucht (siehe Kapitel 2.2.5.4.1). Zuvor wurden für jeden getesteten Bakterienstamm die geeignetsten Histonvolumina mit Hilfe eines so genannten Checkerboard-Assays ausgetestet. Hierbei kann die Wirksamkeit individueller Komponenten überkreuz bei unterschiedlichen Konzentrationen analysiert werden. Anhand dieser Vorarbeit konnte als ideale Konzentration 1 µg Histon in einem Endvolumen von 100 µl ermittelt werden (= 10 µg/ml).

Bereits in einem Overlay Histogramm können die kombinierten Effekte der Histone beobachtet werden. Als Beispiel wurde die Wirkung gegen den Bakterienstamm *E. coli* Patientenisolat 395 in Abbildung 26 dargestellt. Zu sehen ist dort die Fluoreszenz (FL1) der unbehandelten Kontrolle im Vergleich mit den Histon-behandelten Zellen. H2A alleine wirkt in dieser geringen Konzentration nicht abtötend, H4 leicht abtötend. Zu einer deutlichen Verstärkung der Fluoreszenz kommt es durch den kombinierten Einsatz der Histone H2A und H4.

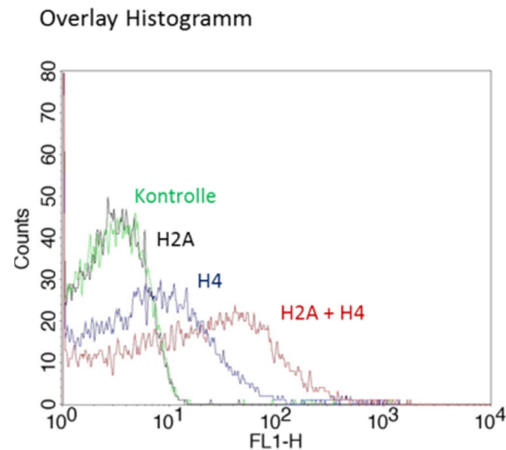
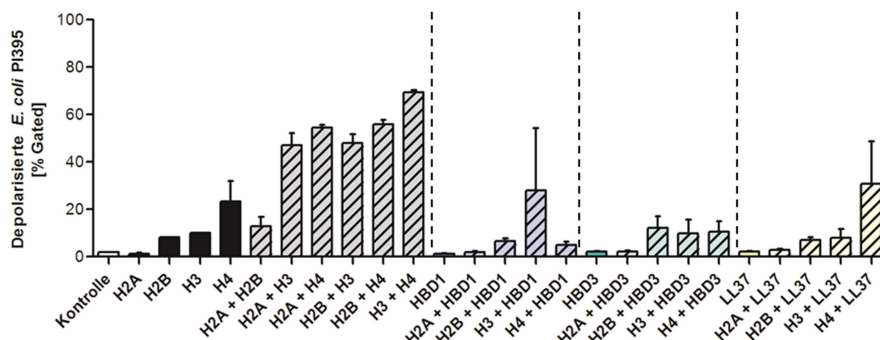


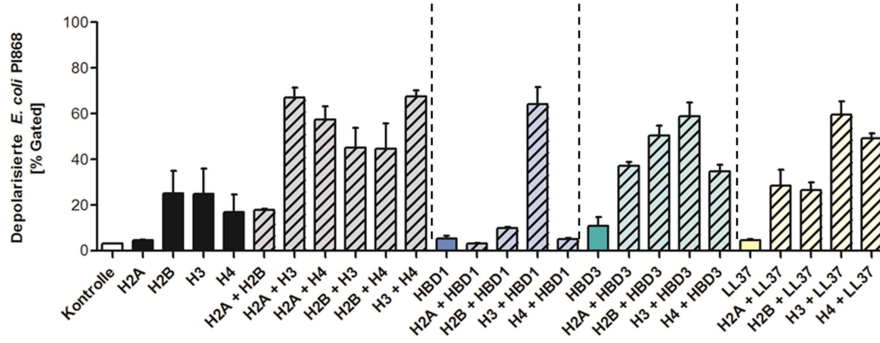
Abbildung 26 Overlay Histogramm der FL1-Fluoreszenz des unbehandelten *E. coli* Patientenisolats 395 (grün) und der mit H2A (schwarz), H4 (blau) und H2A + H4 (rot) behandelten Zellen. Gemessen wurde nach der Inkubation mit dem fluoreszierenden Farbstoff DiBAC₄(3).

Anschließend wurde die antimikrobielle Aktivität aller Histon-Histon- bzw. Histon-Defensin-Kombinationen bestimmt. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Synergismusstudie gegen vier Bakterienstämme sowie jeweils zwei Patientenisolaten dargestellt. Als additiv wird im Folgenden eine Kombination der Histone untereinander bzw. Histone mit AMPs bezeichnet, deren antimikrobielle Aktivität zusammen einen höhere Wert zeigt, als das stärkste Peptid alleine. Von einem Synergismus wird dagegen erst gesprochen, wenn die Kombinationen der untersuchten Stoffe zusammen größere Effekte zeigen, als die antimikrobielle Aktivität der beiden Peptide zusammen. Es wurden möglichst geringe Konzentrationen der Einzelsubstanzen verwendet, sodass additive Effekte noch erkannt werden können.

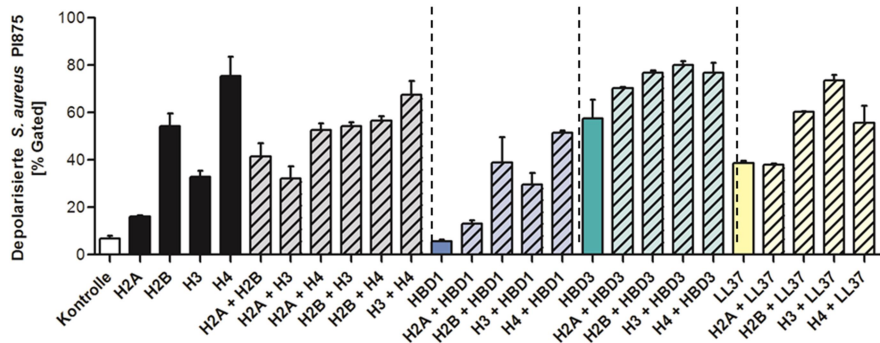
A *E. coli* Patientenisolat 395



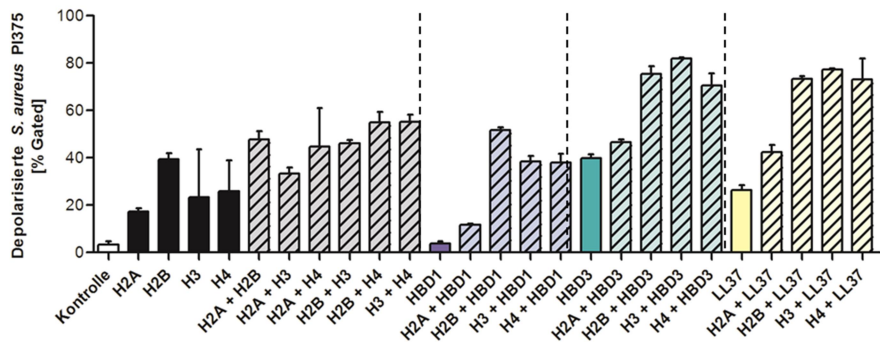
B *E. coli* Patientenisolat 868



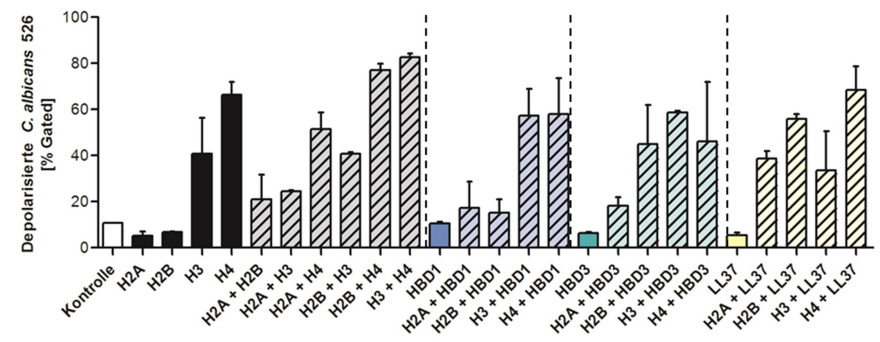
C *S. aureus* Patientenisolat 875



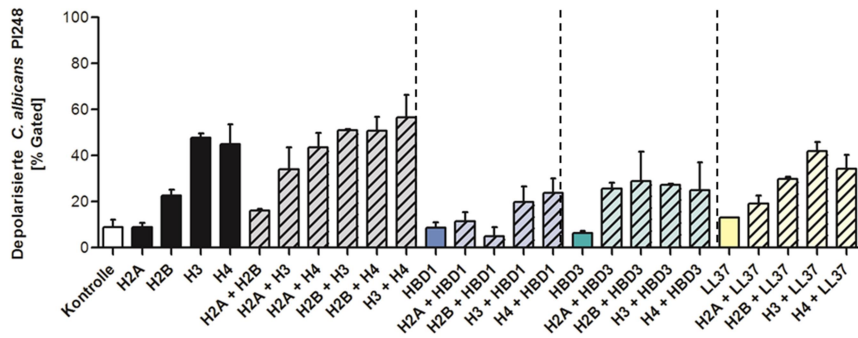
D *S. aureus* Patientenisolat 375



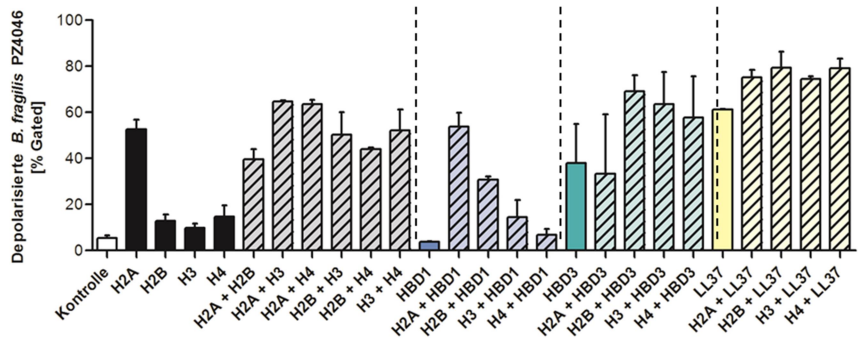
E *C. albicans* Patientenisolat 526



F *C. albicans* Patientenisolat 248



G *B. fragilis* PZ 4046



H *B. fragilis* Patientenisolat 288

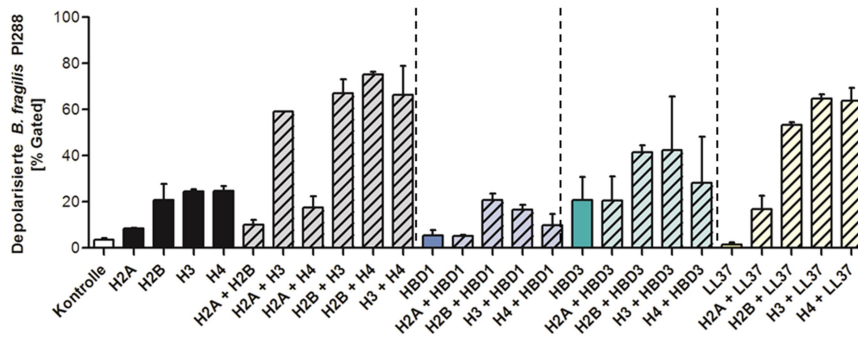


Abbildung 27 Antimikrobielle Aktivität rekombinanter Histone alleine (schwarz), in Kombination untereinander (grau gestrichelt) sowie in Kombination mit HBD1 (blau), HBD3 (grün) und LL37 (gelb) gegen *E. coli* Patientenisolat 395 (A), *E. coli* Patientenisolat 868 (B), *S. aureus* Patientenisolat 875 (C), *S. aureus* Patientenisolat 375 (D), *C. albicans* PI526 (E), *C. albicans* Patientenisolat 248 (F), *B. fragilis* PZ4046 (G) und *B. fragilis* Patientenisolat 288 (H). Eingesetzt wurde jeweils eine Histon- bzw. AMP-Konzentration von 10 µg/ml. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durchflusszytometrisch.

Wie in Abbildung 27 zu erkennen, konnte bei sehr vielen Kombinationen eine additive oder sogar synergistische Wirkung beobachtet werden. Gegen das Patientenisolat 395 von *E. coli* zeigten vor allem die Histonkombinationen große synergistische Effekte, wohingegen die Kombinationen mit den Defensinen HBD1 und HBD3 sowie mit dem Cathelicidin LL37 nur geringe Wirkungssteigerungen erkennen ließen. Im

Vergleich dazu zeigten die Kombinationen der Histone und die Kombinationen mit AMPs bei Patientenisolat 868 von *E. coli* fast immer additive bzw. synergistische Effekte. Die deutlichsten Effekte ließen die H3-Kombinationen H2A+H3, H3+H4, H3+HBD1, H3+LL37 bei beiden *E. coli* Stämme und die H3-Kombination H3+HBD3 bei *E. coli* PI868 erkennen (bis zu 70 % depolarisierten Zellen).

Die beiden *S. aureus* Patientenisolate zeigten ein anderes Bild. Bei Patientenisolat 875 waren bereits die Histone alleine sehr stark antimikrobiell aktiv mit Werten von 50 % depolarisierten Bakterien bei Histon H2B und sogar 70 % bei H4. Aufgrund dessen konnten durch die Kombination der Histone untereinander lediglich additive Effekte erzielt werden. Das gleiche Bild zeigte sich bei den Kombinationen der Histone mit HBD3 und LL37. Nur HBD1 zeigte bei diesem Patientenisolat synergistische Effekte. Gegen *S. aureus* PI375 konnten bei den Histonkombinationen additive Effekte sowie bei Kombinationen mit den AMPs synergistische Effekte festgestellt werden. Auch hier waren die H3-Kombinationen am effektivsten (über 80 % depolarisierten Zellen). Daneben wurde die Hefe *C. albicans* untersucht. Dabei zeigte der Stamm 526 immer additive bzw. synergistische Effekte. Ferner fällt die starke Wirkung der beiden Histone H3 und H4 auf, die bereits alleine 40 % bzw. 60 % der Hefen abtöten konnten. Der zweite getestete *C. albicans* Stamm PI248 zeigte nur geringe Aktivität. Lediglich bei den Histonkombinationen konnten additive Effekte nachgewiesen werden.

Abschließend wurde die kombinierte Wirkung der Histone untereinander bzw. mit den AMPs gegen *B. fragilis* getestet. Bei PZ4046 zeigten sich deutliche additive und synergistische Effekte. Histon H2A, HBD3 und LL37 ließen bereits alleine eine sehr hohe antimikrobielle Aktivität mit bis zu 60 % depolarisierten Bakterien erkennen. Der zweite getestete *B. fragilis* Stamm PI288 zeigte in allen getesteten Kombinationen hohe Effekte.

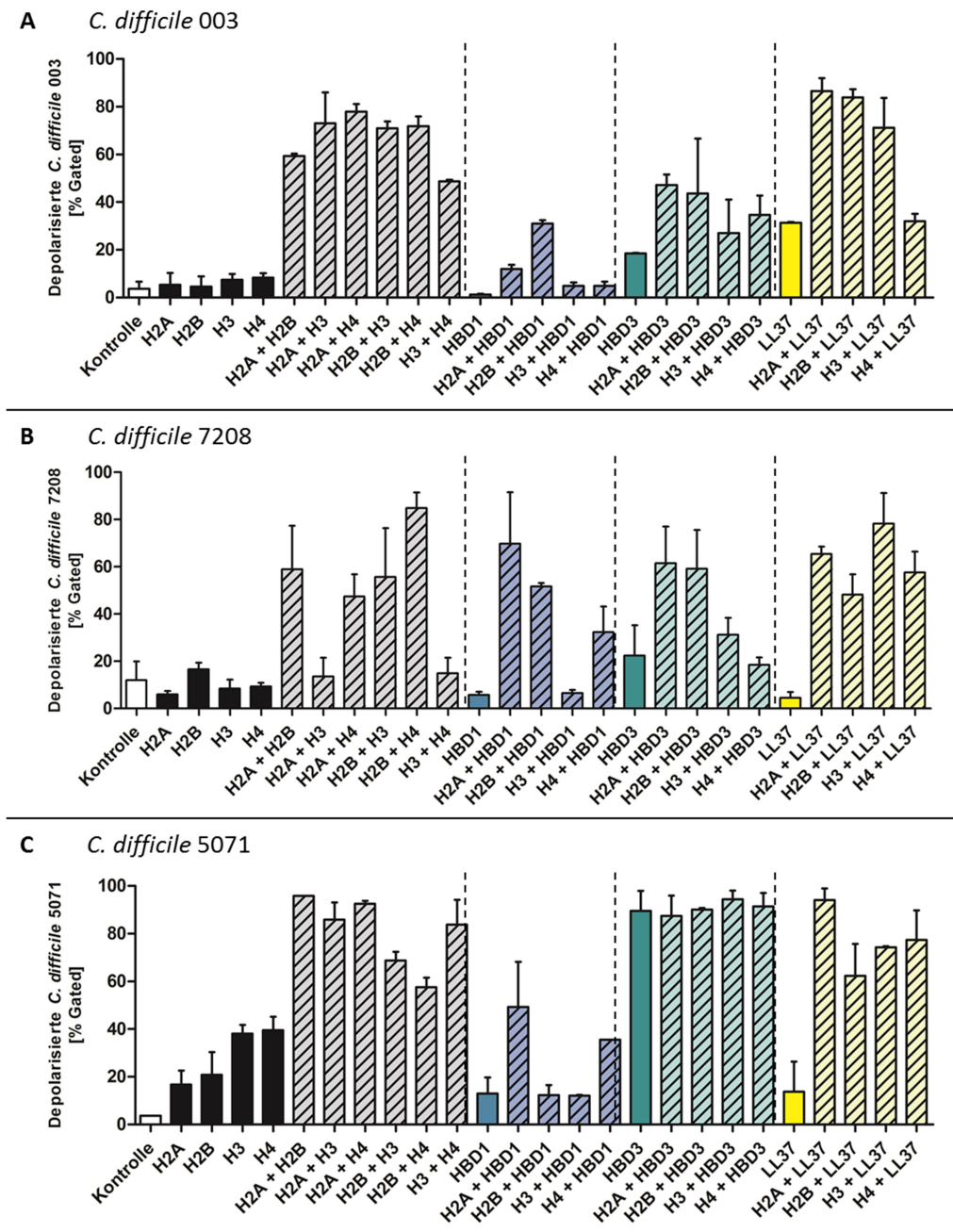
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die antimikrobielle Aktivität der Histone durch eine Kombination der Histone untereinander und durch eine Kombination der Histone mit verschiedenen AMPs teils beträchtlich gesteigert werden kann. Diese Wirkung ist jedoch stammspezifisch und jede Kombination erzielte bei den getesteten Mikroorganismen unterschiedlich starke Effekte.

3.3.2 Histone versus Clostridien

Das sporen- und toxinbildende grampositive Bakterium *C. difficile* gehört zu den häufigsten Krankenhauskeimen. Im Falle einer gestörten Darmflora vermehrt es sich und kann zu schwerer nosokamialer Diarrhoe (*C. difficile* assoziierte Durchfälle, CDAD) führen. Pathogene Stämme produzieren Toxin A und/oder B, die hauptsächlich für die Symptome verantwortlich sind. Toxin A ist ein Enterotoxin, das schwere Diarrhoe hervorruft und für die Entzündung des Dickdarms verantwortlich ist. Toxin B ist ein membranschädigendes Cytotoxin. Neben der durchflusszytometrischen Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der Histone gegen verschiedene *C. difficile*-Stämme wurde auch die Toxinbildung pathogener Stämme untersucht (siehe Kapitel 2.2.5.6).

Die antimikrobielle Aktivität der Histone wurde alleine, in Kombination untereinander und zusammen mit HBD1, HBD3 und LL37 durchflusszytometrisch gegen vier Clostridienstämme aus Patientenisolaten untersucht (siehe Abbildung 28). Die Wirkung der Histone alleine ist bei fast allen untersuchten Bakterienstämmen sehr gering (10 bis 15 % Depolarisation). Lediglich bei *C. difficile* PI 5071 zeigte sich eine höhere Aktivität der Histone H3 und H4 mit rund 40 % depolarisierten Bakterien. Durch die Kombination von je zwei Histonen untereinander konnte eine deutliche synergistische Wirkung erzielt werden. Diese Wirkung fiel bei *C. difficile* 003 mit ca. 60 bis 80 % depolarisierten Bakterien besonders deutlich aus. Alleine eingesetzt war der Wirkungsgrad der Defensine HBD1 und HBD3 mit dem der Histonen vergleichbar (5 bis 15 % Depolarisation). Eine Ausnahme bildete der Stamm *C. difficile* PI 5071, bei dem bereits die Abtötung durch HBD3 mit fast 90 % depolarisierten Bakterien im oberen Bereich lag. Auch durch die Kombination mit Histonen konnte keine weitere Erhöhung der Depolarisation erreicht werden. Bei allen anderen Stämmen war durch die Defensin-Histon-Kombination eine additive bzw. synergistische Wirkung festzustellen. Das Cathelicidin LL37 zeigte alleine gegen alle Clostridienstämme eine Depolarisation von 10 bis 30 %. Auch hier konnte in Kombination mit Histonen eine additive bzw. synergistische Wirkung erzielt und die Bakterienabtötung auf bis zu 80 % erhöht werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die antimikrobielle

Wirkung der einzelnen untersuchten Stoffe durch einen kombinierten Einsatz erhöht werden kann und sich starke synergistische Effekte erzielen lassen.



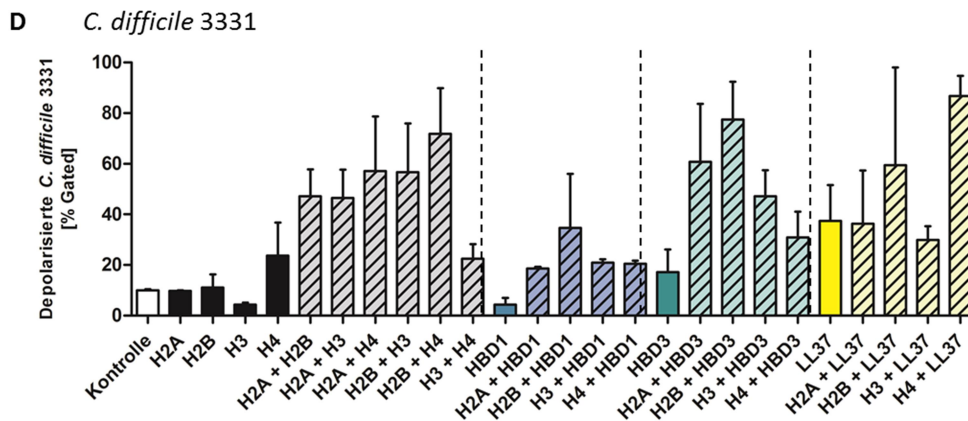


Abbildung 28 Antimikrobielle Aktivität der rekombinanten Histone alleine (schwarz), in Kombination untereinander (grau gestrichelt) und in Kombination mit HBD1 (blau), HBD3 (grün) und LL37 (gelb) gegen die Clostridienstämme *C. difficile* 003 (A), 7208 (B), 5701 (C) und 3331 (D). Eingesetzt wurde jeweils eine Histon- bzw. AMP-Konzentration von 10 µg/ml. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durchflusszytometrisch.

Während einer Antibiotikatherapie kann es im Darm zu einer übermäßigen Vermehrung von pathogenen *C. difficile* kommen, die die Toxine A und B freisetzen. Um eine mögliche Toxin A/B-Induktion durch Histone zu testen, wurde der Ridascreen® Enzymimmunoassay von R-Biopharm nach Herstellerangaben verwendet (siehe Kapitel 2.2.5.6). In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Toxin A/B-Produktion nach Inkubation der acht untersuchten *C. difficile* Patientenisolat mit den Histonen alleine und in Kombination untereinander dargestellt. Die Hälfte der getesteten Bakterienstämme zeigte sich hierbei positiv für Toxin A/B. Am stärksten, war die Toxinproduktion bei Isolat 1856 mit Extinktionswerten von max. 3,5 (bei 450 nm). Drei weitere Stämme (PI 6504, 7208 und 3331) erwiesen sich Toxin A/B positiv mit Extinktionswerten von 0,7 bis 1,6 (bei 450 nm). Bei den Histonkombinationen war hingegen keine gesteigerte Toxinproduktion erkennbar. Die Extinktionswerte waren vergleichbar und fielen teilweise sogar niedriger aus. Zwei der untersuchten Stämme Isolat 5071 und 5684 waren komplett Toxin A/B negativ. Die restlichen beiden PI 5397 und 9810 zeigten einen erhöhten Extinktionswert bei Histon H2A und eine gesteigerte Toxinproduktion bei den drei H2A-Histonkombinationen (H2A/H2B, H2A/H3 und H2A/H4).

		C. difficile Patientenisolate							
		1856	5071	6504	7208	3331	5397	5684	9810
Extinktion bei 450/620 nm	Positivkontrolle	1,351	1,082	1,062	1,351	1,363	1,363	0,997	0,997
	Negativkontrolle	0,000	0,003	0,003	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001
	Kontrolle (-)	3,500	0,002	1,751	0,876	1,313	0,079	0,002	0,040
	H2A	3,581	0,004	1,792	0,898	1,345	0,148	0,002	0,075
	H2B	3,637	0,002	1,819	0,911	1,365	0,070	0,003	0,036
	H3	3,221	0,002	1,611	0,807	1,209	0,089	0,003	0,046
	H4	3,281	0,006	1,643	0,824	1,234	0,073	0,002	0,037
	H2A + H2B	3,342	0,003	1,672	0,837	1,255	0,562	0,001	0,282
	H2A + H3	2,975	0,008	1,491	0,750	1,120	0,649	0,001	0,325
	H2A + H4	3,174	0,002	1,588	0,795	1,191	0,473	0,002	0,237
	H2B + H3	2,974	0,002	1,488	0,745	1,116	0,094	0,002	0,048
	H2B + H4	3,393	0,003	1,698	0,850	1,274	0,201	0,002	0,101
	H3 + H4	3,044	0,004	1,524	0,764	1,144	0,101	0,002	0,052

Abbildung 29 Toxin A/B-Produktion verschiedener *C. difficile* Patientenisolate durch Histone bzw. Histonkombinationen. Eingesetzt wurden 2 µg Histonextrakt pro 100 µl Clostridiensuspension. Der Cut off ist die Extinktion der Negativkontrolle +0,15. Zur besseren Visualisierung wurden die Extinktionen farblich markiert (je dunkler desto mehr Toxin).

3.3.3 RDA

Antimikrobiell aktive Substanzen wie Histone und Defensine breiten sich aufgrund von Diffusion im Agar aus und töten die Bakterien kreisförmig ab. Werden nun zwei Ausstanzungen mit den zu testenden Stoffen im Abstand ihres jeweiligen Hemmhofradius nebeneinander gelegt, verbinden sich die beiden Hemmhöfe und zeigen ebenfalls synergistische Wirkungen.

Getestet wurde auf Schaedler-Bouillon-Platten gegen *S. aureus* ATCC 25923. Die Kontrolle mit bidest. Wasser zeigte keinen Hemmhof im Bakterienrasen. Dagegen konnten bei HBD3 sowie den Histonen H2A und H2B Hemmhöfe beobachtet werden. Der größte Wirkungsbereich zeigte sich bei HBD3 mit einem Durchmesser von 2,1 cm. Die Durchmesser der Histonhemmhöfe fielen mit 1,8 cm bzw. 1,9 cm etwas geringer aus. Durch die nebeneinander angelegten Ausstanzungen konnte die bereits bekannte synergistische Wirkung der kombinierten Substanzen visualisiert werden. In der Grenzregion der beiden Hemmhöfe zeigte sich auf beiden Seiten ein kleiner Bereich ohne Bakterienwachstum (siehe Abbildung 30).

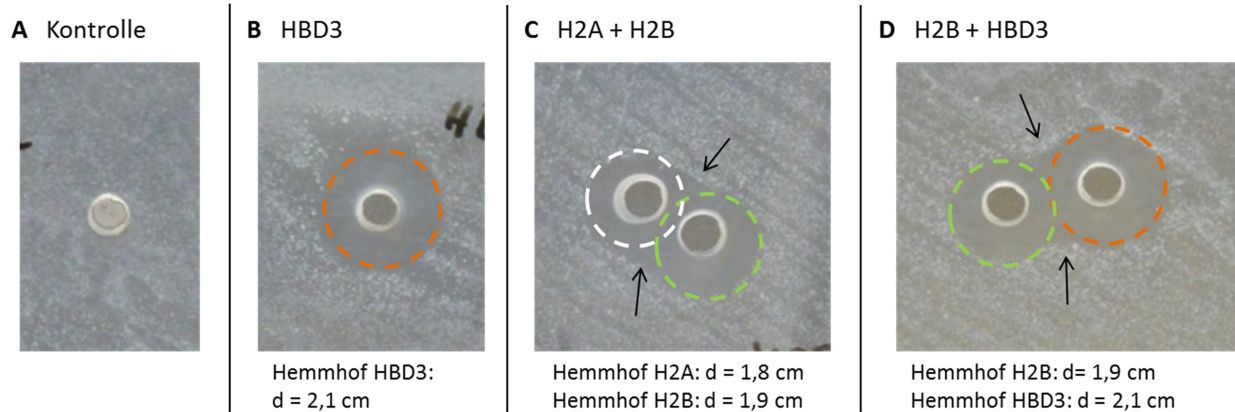


Abbildung 30 RDA gegen *S. aureus* ATCC 25923 auf Schaedler-Bouillon-Platten. Zu sehen sind die Ausstanzungen der Negativkontrolle mit bidest. Wasser (A) sowie die Hemmhöfe durch HBD3 (B), H2A+H2B (C) und H2B+HBD3 (D). Die Ausstanzungen mit einem Durchmesser, d von 3 mm wurden mit je 3 μl HBD3, H2A und H2B in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ befüllt. Die Pfeile zeigen die synergistischen Wirkungen der aneinander liegenden Bereiche der Hemmhöfe.

3.3.4 Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde die Wirkungsweise der Histone alleine und in Kombination bzw. in Kombination mit HBD3 visualisiert. Im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen ließen die mit den Kernhistonen behandelten *E. coli* ATCC 25922 Zellen einen Verlust der Zellintegrität erkennen. Dabei zeigte sich die stärkste Zerstörung bei den Histonen H3 und H4. Die mit HBD3, H2A und H2B behandelten Zellen zeigten dagegen nur leichte Zerstörungen der Zellstruktur mit Austritt von Zellbestandteilen. Im Vergleich zu den einzeln behandelten Zellen zeigte die Kombination von H2A und HBD3 eine deutlich verstärkte Wirkung (siehe Abbildung 31).

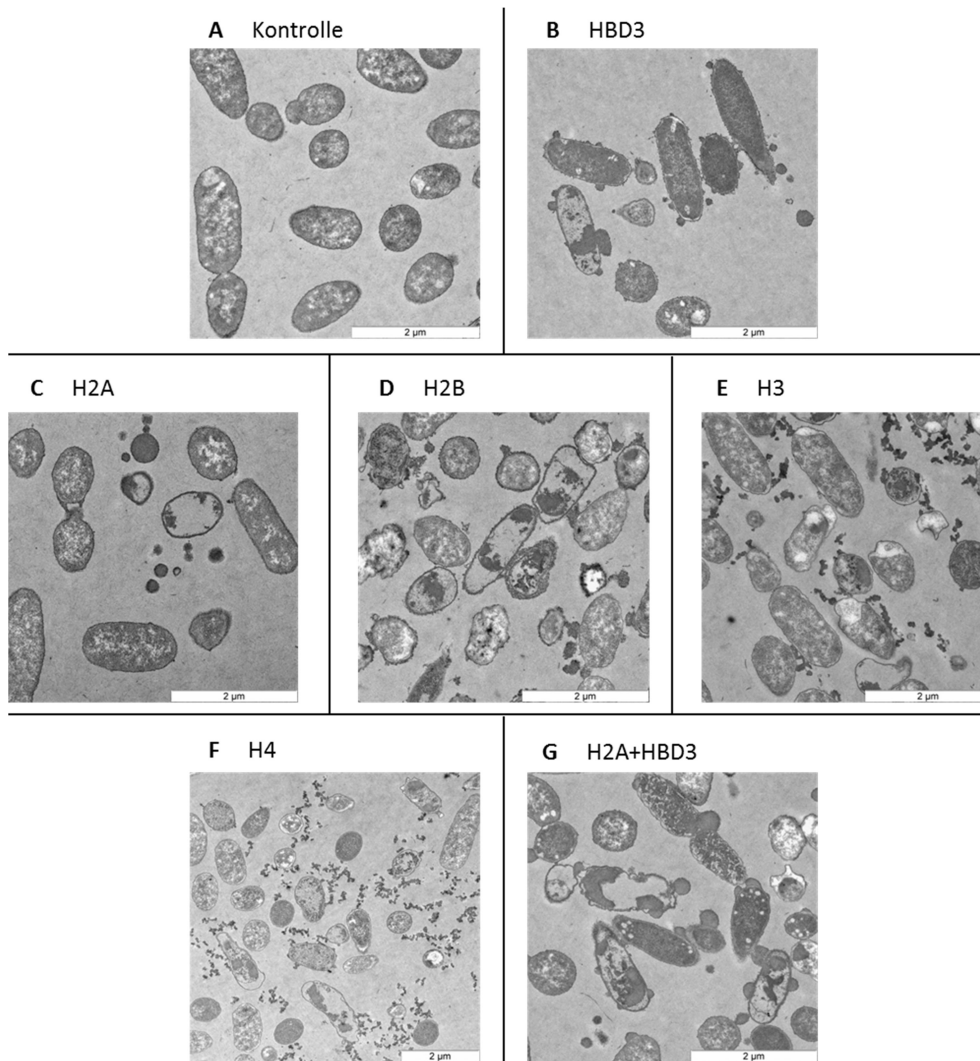


Abbildung 31 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Histon- bzw. Defensinwirkung gegen *E. coli* ATCC 25922. Zu sehen sind die unbehandelten *E. coli* ATCC 25922 (A) sowie die mit HBD3 (B), den Kernhistonen H2A (C), H2B (D), H3 (E) und H4 (F) und der H2A+HBD3 kombiniert behandelten Zellen.

In Abbildung 32 sind die mikroskopischen und elektronenmikroskopischen Bilder der unbehandelten Kontrolle sowie der mit H3, H2B und H3 in Kombination behandelten vegetativen Zellen von *C. difficile* 003 dargestellt. In den angefärbten mikroskopischen Aufnahmen ist eine deutliche Verklumpung der Bakterien nach Histonbehandlung zu erkennen. Diese Verklumpung konnte durch den kombinierten Einsatz von H2B und H3 nochmals verstärkt werden. Darüber war nach der Inkubation der Bakterien mit Histon H3 unter dem Elektronenmikroskop eine starke Zerstörung der Zellstruktur zu erkennen. Zu sehen sind eine Ruptur der Bakterienmembran und der Austritt von Zellbestandteilen. Die Zelle ist vollständig zerstört. Durch die Kom-

bination der beiden Kernhistone H2B und H3 konnte die Rate der zerstörten *C. difficile*-Zellen nochmals gesteigert werden. Ein synergistischer Effekt kann damit bestätigt werden.

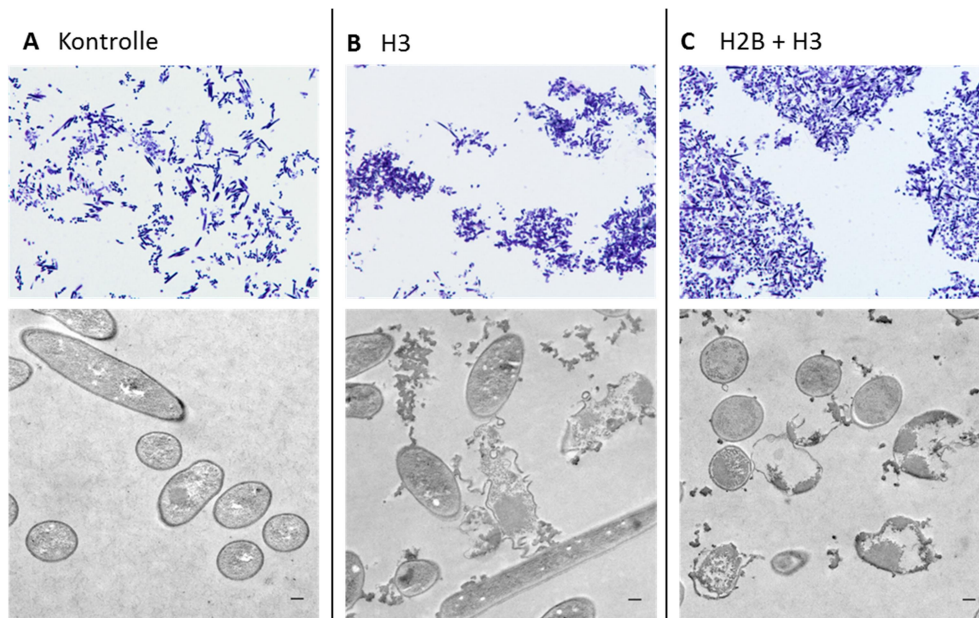


Abbildung 32 Mikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahmen der Histonwirkung gegen vegetative Zellen von *C. difficile* 003. Im oberen Teil sind die mikroskopischen Bilder der mit Methylenblau gefärbten Bakterien zu sehen. Im unteren Teil ist die Morphologie der unbehandelten Kontrollen (A), der mit H3- (B) und der H2B- und H3-behandelten Bakterien (C) mittels Elektronenmikroskopie abgebildet.

4 Diskussion

4.1 Teil 1 – Systematische Analyse der Kernhistone

Die Epithelzellen des Darms sind in der Lage durch die Produktion von AMPs eine Bakterienkolonisation der Mukosa zu verhindern (Wehkamp, et al. 2009). Allerdings kann eine defekte Barriere – beispielsweise durch eine verringerte oder fehlerhafte AMP-Synthese – zu einer Anlagerung und Invasion von Mikroorganismen in der Mukosa führen und Entzündungen fördern. Bei MC-Patienten konnte bereits eine verringerte Expression der Defensine HBD1, -2, -3 und -4 (Fahlgren, et al. 2003 und 2004, Wehkamp, et al. 2002 und 2003, Fellermann, et al. 2006, Peyrin-Biroulet, et al. 2010) sowie LL37 (Schauber, et al. 2006) in der Kolonmukosa festgestellt werden. Peptide mit anderen funktionellen Eigenschaften verhindern mit ihrer antimikrobiellen Aktivität ebenfalls Anlagerung und Invasion von Bakterien ins Epithel. Eine wichtige Gruppe dieser Peptide sind die Histone. Als Bestandteil des Chromatins sind sie zum einen für die Verpackung der DNA verantwortlich und zum anderen Ort posttranslationeller Modifikationen. Extrazelluläre Histone zeigen darüber hinaus eine starke antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen (Miller, et al. 1942, Hirsch 1958). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb bei Kolonbiopsien eine systematische Analyse des Transkriptom (siehe Kapitel 3.1.2) und Translatoms (siehe Kapitel 3.1.3) der Kernhistone durchgeführt.

Die molekulare Biologie befasst sich mit dem Informationstransfer von DNA via mRNA zu Proteinen. Dieser Weg ist heute mechanistisch sehr gut verstanden: Gene werden transkribiert, mRNA prozessiert, an den Ribosomen sequenziell in Aminosäureketten translatiert und in funktionelle Proteine gefaltet. Doch wie korrelieren diese zwei Klassen der biologischen Moleküle miteinander? Bisher konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die auf dieses Wechselverhältnis einwirken. Methodologische Bedingungen spielen jedoch ebenfalls eine Rolle beim Vergleich des mRNA- mit dem Proteinlevel. Um biologische Prozesse zur Gänze zu verstehen, ist es von essentieller Bedeutung, Unterschiede in der mRNA und im translatierten Protein zu erkennen.

Die Quantifizierung der Genexpression ergab eine extreme Spannweite der Expressionsstärke (siehe Abbildung 7), die sich bei allen Kernhistonen und unabhängig von der untersuchten Gruppe nachweisen lässt. Extrem hohe Expressionswerte traten jedoch nur bei Erkrankungen auf. Eventuell wird durch die hohe Expression eine abnormale Abschilferung von Zellen und der damit verbundene Histonverlust ausgeglichen. Aufgrund der starken Streuung der Werte der untersuchten Patientenproben ist eine Interpretation der Daten schwierig. Auffällig ist jedoch die erhöhte mRNA-Expression bei MC infl in allen vier Kernhistonen, die in drei Fällen (*h2a*, *h2b* und *h3*) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen auch signifikant war. Studien über die Kernhistone im Darm wurden bisher nicht veröffentlicht, aber in anderen Geweben konnte bei Tumorerkrankungen eine erhöhte Histon-mRNA-Expression nachgewiesen werden. So zeigte sich beispielsweise eine signifikante Überexpression des Gens *hist1h2ah*, das für die H2A-Variante H2A.1 codiert, während der Karzinogenese von hepatozellulärem Krebs in der Ratte (Khare, et al. 2011). Eine Überexpression von vier verschiedenen humanen Histon-codierenden Genen (*hist1h2ac*, *hist1h2bf*, *hist1h2bo* und *hist1h1d*) konnten in Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden (Pärssinen, et al. 2008). Auch in humanem kolorektalem Tumorgewebe konnte eine Überexpression von *cenp-a*, das für ein H3-like Protein codiert, detektiert werden (Tomonaga, et al. 2003). Veränderungen auf der mRNA-Ebene werden in der Literatur häufig als Hinweise auf funktionale Veränderungen interpretiert.

Die Quantifizierung der Kernhistonproteine im untersuchten Darmgewebe ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Innerhalb der Gruppen zeigten sich vor allem bei H2B und H3 starke Streuungen. Vergleichbare Untersuchungen liegen auch hier nur zu Tumorerkrankungen vor. Zhu et al. zeigten beispielsweise in mehreren Arbeiten, dass es in Östrogen-behandelten humanen MCF-7-Brustkrebszellen zu einer Hochregulierung der Histone H2B, H3 und H4 kommt (Zhu, et al. 2008 und 2009). Außerdem ließen sich erhöhte endogene Konzentrationen der Histonvariante γ H2AX in den verschiedensten humanen Krebszelllinien erkennen, wie zum Beispiel in zervikalen (Banáth, et al. 2004), ovarialen (Yu, et al. 2006), Brust- (Nagelkerke, et al. 2011), Leukämie- sowie Melanom-, Kolon-, renalen und Prostata-Krebszelllinien (Sedelnikova und Bonner 2006).

Trotz der erhöhten mRNA-Expression bei MC infl konnte keine erhöhte Proteinmenge detektiert werden. Korreliert man die Ergebnisse der mRNA- und Proteinexpression aller Kernhistone miteinander (siehe Abbildung 10), lässt sich kein direkter Zusammenhang erkennen. Zwar sind RT-PCR und Western Blot-Analysen gängige Methoden um Muster in der Gen- und Proteinexpression zu erkennen, doch Korrelationen von mRNA- und Proteinleveln sind bislang in der Literatur kaum beschrieben. Dafür wurden drei Gründe postuliert: (1) Eingreifen von posttranskriptionalen Mechanismen beim Übergang von mRNA zu Proteinen, (2) Substantielle Unterschiede der *in vivo* Halbwertszeit von Proteinen durch die Kontrolle der Degradations- oder Syntheserate und (3) Fehlerquellen innerhalb der mRNA- und Proteinbestimmung (Greenbaum, et al. 2003). Im vorliegenden Fall wird die Expression der Histon-gene durch den Zellzyklus reguliert und auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene durch die Überprüfung der nukleären RNA-Prozessierung, Translation und Histon-mRNA-Stabilität kontrolliert (Nicholson und Müller 2008). Synthese der Histonproteine und DNA-Replikation müssen ausgeglichen sein, da andernfalls die Genexpression sowie die Chromosomenkondensation beeinflusst wird und es zu Fehlern bei der Chromosomentrennung während der Mitose kommt (Sullivan, et al. 2001, Pettitt, et al. 2002, Rattray und Müller 2012). Eine Erklärung für die nicht korrelierenden Werte könnte also die Hochregulierung der Histongenexpression bei MC infl durch einen erhöhten Zellumsatz sein, während der Proteinlevel in der Mukosa ungefähr gleich bleibt.

Bei der Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von Proteinextrakten aus Kolonbiopsien gegen die beiden Stämme *E. coli* K12 und *B. adolescentis* (siehe Abbildung 11) konnte bei *E. coli* K12 eine signifikant verringerte antimikrobielle Aktivität der Proteinextrakte der MC-Patienten festgestellt werden. Bereits in einer vorangegangenen Arbeit, in der die antimikrobielle Aktivität von Biospieextrakten von CED-Patienten gegen diverse Bakterien untersucht wurden, zeigte sich eine verringerte antimikrobielle Aktivität bei MC- gegenüber den Kontroll- und CU-Patienten (Nuding, et al. 2007). Im Vergleich zu den *E. coli* K12-Ergebnissen unterscheiden sich die Ergebnisse der antimikrobiellen Wirkung gegen *B. adolescentis* nicht zwischen den getesteten Gruppen. Ausschlaggebend dürfte hierfür auch die starke Streuung in-

nerhalb der Gruppen sein. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit bei *E. coli* eine extreme Zweiteilung der antimikrobiellen Aktivität innerhalb der Kontroll- und CU-Gruppen festgestellt werden. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die AMP-Synthese bei CU-Erkrankten im Gegensatz zu MC-Patienten nicht verringert ist, weshalb es nicht zu einer Herabsetzung der antimikrobiellen Aktivität kommt (Nuding, et al. 2007, Schmid, et al. 2007). Diese Erkenntnisse konnten in der vorliegenden Arbeit aufgrund der Zweiteilung der CU-Gruppen teilweise bestätigt werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, neben der Vitalitätsbestimmung, qualitative Unterschiede in der Zellmorphologie festzustellen (siehe Abbildung 12). Bei *E. coli* K12 konnten nur in manchen Fällen eine reduzierte bakterielle Zellgröße sowie verminderte Granularität in jeder Gruppe nachgewiesen werden. Diese Wirkung könnte durch einen zusätzlichen synergistischen stamm- oder speziesspezifischen Effekt der AMPs hervorgerufen werden. So fanden Hyde et al. vergleichbare Veränderungen bei *Bacillus subtilis* nach einer Nisin-Behandlung (Hyde, et al. 2006).

4.2 Teil 2 - Extraktion und Analyse der Histone im Kolon

Unter normalen physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation, mit einem kompletten Zellturnover alle 24 bis 96 Stunden (Potten, et al. 1992), und Verlust intestinaler Epithelzellen durch den natürlichen Zelltod, Apoptose sowie mechanischer Abschilferung. Bei CED und anderen Erkrankungen des Darms kommt es zu einer massiven Zerstörung und Beeinträchtigung der intestinalen Oberfläche (Dignass 2001). Aufgrund dieser ausgeprägten Desquamation der Epithelzellen wird theoretisch auch eine große Menge extrazellulärer Histone freigesetzt, die sich im Bereich des Mukus anreichern. Veränderungen der durch Histone bedingten antimikrobiellen Aktivität könnten somit als weiterer pathologischer Defekt gewertet werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zunächst die Histone aus Kolonresektaten, Kolonbiopsien und Mukusabstrichen isoliert. Um die Extraktion zu überprüfen, wurden die isolierten Histone aus drei Kolonresektaten mit Hilfe einer HPLC fraktioniert (siehe Abbildung 14) und anschließend per Massenanalyse mit MALDI-TOF-MS

(siehe Abbildung 16, Abbildung 17 und Abbildung 18) untersucht. Die Fraktionierung durch RP-HPLC zeigte bei allen Histonextrakten ein vergleichbares Muster. Die Entnahmezeiten belegen darüber hinaus die Übereinstimmung der einzelnen Fraktionen miteinander (siehe Tabelle 26). Deutliche Unterschiede waren im Volumen festzustellen: Das Volumen H2A, H2B und H3 lag um ein Vielfaches höher als das Volumen von H4 (siehe Abbildung 14). Ob in den gewonnenen HPLC-Fractionen Histone isoliert vorliegen, wurde mittels Massenanalyse per MALDI-TOF-MS geprüft. Die vier Kernhistone konnten bei allen Histonextrakten in einander entsprechenden Fraktionen gefunden werden. Daneben wurden in weiteren HPLC-Fractionen auch unbekannte Peptide festgestellt (siehe Abbildung 19), die eventuell ebenfalls Einfluss auf die Aktivität der Extrakte haben. HPLC und MALDI-TOF-MS sind gängige Methode, um die verschiedenen Histonklassen voneinander zu trennen (Lindner, et al. 1986, Zhang und Tang 2003, Galasinski, et al. 2003, Naldi, et al. 2006). Aufgrund zahlreicher Histonvarianten, die sich in ihrer primären Struktur nur minimal voneinander unterscheiden sowie der verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung, die jedes Histon nochmals in seiner lokalen Ladung, Struktur und Masse verändert, sind Isolierung und Identifizierung der jeweiligen Histone eine Herausforderung (Sarma und Reinberg 2005, Draizen, et al. 2016).

Anschließend wurden die HPLC-Fractionen auf ihre antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli* K12 untersucht (siehe Abbildung 20). Dabei zeigten die HPLC-Fractionen mit den darin enthaltenen Histonen H2A, H2B und H3 eine sehr hohe bakterizide Wirkung. Lediglich bei Histon H4 war nur eine schwache Aktivität zu beobachten, was auf das geringe Fraktionsvolumen zurückzuführen ist. Da zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität bei allen HPLC-Fractionen die gleiche Menge eingesetzt wurde, war bei H4 somit in Relation weniger aktives Histon enthalten, als bei den anderen untersuchten Peptiden. Die unbekannt Peptide/Proteine, die bisher keinem Histon eindeutig zugeordnet werden konnten, haben zwar ebenfalls leicht bakterizide Eigenschaften, die gemessene deutliche antimikrobielle Wirkung ist allerdings auf die HPLC-Anreicherung zurückzuführen. Da die Unbekannten nur ein

sehr geringes Volumen des Gesamtextraktes ausmachen, sind ihre antimikrobiellen Eigenschaften im Vergleich mit den Kernhistonen vernachlässigbar.

Mit Hilfe immunhistologischer Färbungen von Gewebeschnitten konnten die Histone im Zellverband analysiert werden (siehe Abbildung 21). Neben der zu erwartenden positiven Färbung fast jedes Nucleus', konnten auch im Mukus extrazelluläre Histone detektiert werden, die vor allem durch Apoptose von Zellen freigesetzt wurden. Die Histone H3 und H4 waren sehr deutlich im Mukus angereichert. Große Glykoproteine, wie Muzine, sind essentiell für die Bildung einer intakten und stabilen Mukusschicht (Dharmani, et al. 2009, Kim und Ho 2010). Aufgrund ihrer negativen Ladung sind sie in der Lage kationische AMPs zu binden, ohne ihre funktionellen Eigenschaften zu beeinträchtigen (Antoni, et al. 2013, Antoni, et al. 2014). Extrazelluläre Histone, die ebenfalls sehr stark positiv geladen sind, könnten somit von Muzinen durch elektrostatische Interaktionen gebunden werden und so ebenfalls zur Abwehr von Mikroorganismen beitragen.

Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen gegen verschiedene Mikroorganismen zeigten sich bei allen Mikroorganismen mit Ausnahme des Stamms *S. aureus* ATCC 25923 keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. *S. aureus* ATCC 25923 ließ eine signifikant erhöhte Histonaktivität bei CU infl erkennen. Nicht signifikant aber dennoch erhöht sind die Histonaktivitäten der Gruppen MC infl und CU non infl. Angesichts der divergenten Ergebnisse zwischen den anderen Spezies und *S. aureus* ATCC 25923 wurde ein weiterer Stamm dieser Spezies, das Patientenisolat 375, untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls eine leichte Erhöhung bei CU infl und MC infl. Diese stammspezifischen Ergebnisse lassen eine generell höhere bakterizide Wirkung gegen die grampositiven Stämme *S. aureus* ATCC 25923 und das Patientenisolat 375 sowie gegen den gramnegativen Stamm *B. vulgatus* ATCC 8482 erkennen. Gegen *E. coli* ATCC 25922 und die Hefe *C. albicans* zeigte sich eine relativ geringe antimikrobielle Aktivität der Histonextrakte.

Bislang wurden nur Histone aus verschiedenen Darmgeweben untersucht. Durch immunhistologische Färbungen (siehe Abbildung 21) konnten jedoch auch Histone im Mukus festgestellt werden. In welcher Konzentration diese Histone im Mukus vorkommen und welche antimikrobielle Aktivität sie besitzen, wurden an Histonex-

trakten aus Mukusabstrichen analysiert. Aufgrund der durch die Probeentnahme bedingten geringen Mukusvolumina konnten nur die Kernhistone H2A und H2B exemplarisch analysiert werden. Dabei konnte eine Proteinexpression von durchschnittlich 20 bis 100 pg/ml H2A und H2B gemessen werden (siehe Abbildung 24). Signifikante Unterschiede zwischen den Erkrankungen MC und CU sowie den gesunden Kontrollen waren nicht feststellbar. Im Trend lässt sich dennoch eine leichte Erhöhung der MC- und CU-Gruppe bei H2A sowie bei CU-Patienten bei H2B erkennen. Diese Erhöhung passt zu den bereits beschriebenen Ergebnissen der Histonextrakte aus Resektaten und Biopsien.

Die Aktivität der Mukus-Histonextrakte gegen *E. coli* ATCC 25922 und *S. aureus* ATCC 25923 zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, was wiederum zu den vergleichbaren Histonleveln in den Gruppen passt. Auffällig ist aber auch hier die stärkere Wirkung gegen den grampositiven Stamm *S. aureus* ATCC 25923. Basierend auf der Zusammensetzung ihrer Zellwand lässt sich ein Großteil der Bakterien in zwei Gruppen einteilen: die grampositiven und die gramnegativen Bakterien, deren Unterscheidung auf einem Färbeverfahren basiert (Gram 1884). Die prokaryotischen Zellhüllen der beiden Gruppen unterscheiden sich maßgeblich voneinander. Während sie bei Grampositiven aus einer Zytoplasmamembran, der Phospholipiddoppelschicht und einer darauf aufgelagerten Zellwand aus Peptidoglykan besteht, findet sich bei Gramnegativen eine weitere äußere Membran, die asymmetrisch aufgebaut ist und durch das Membranphosphoglykolipid Lipopolysaccharid (LPS) stabilisiert wird. Die Peptidoglykan bei gramnegativen Bakterien ist erheblich dünner und besitzt andere strukturelle Eigenschaften. Eine Besonderheit bei einigen grampositiven Bakterien, wie beispielsweise bei der Gattung *Staphylococcus*, ist die kovalente Bindung von Teichonsäure an das Peptidoglykan (Endl, et al. 1983). Die Gattung *Candida* gehört zu den asporogenen Hefen, deren Zellhülle aus einer Hefemembran besteht. Diese enthält eine Anzahl Lipide und Pigmente, wie z.B. Sterole, Ergosterine, Melanine und einige Glykolipide, die in prokaryotischen Zellen nicht vorkommen. Die stammspezifische Wirkung der Histonextrakte könnte also mit der Zusammensetzung der Zellhülle zusammenhängen. Die zusätzliche äußere Membran von gramnegativen Bakterien, wie der hier getestete Stamm *E. coli* ATCC

25922, stellt eine Penetrationsbarriere dar, die diesen Bakterien einen zusätzlichen Schutz vor Hydrolyse verleiht. Allerdings zeigte sich auch gegen den gramnegativen Stamm *B. vulgatus* ATCC 8482 eine etwas höhere antimikrobielle Aktivität. Ein Großteil antimikrobieller Peptide töten Bakterien durch Membranruptur (Jenssen, et al. 2006). Einige wenige jedoch, wie Pyrrhocoricin (Kragol, et al. 2001) und Indolicidin (Subbalakshmi und Sitaram 1998) sind in der Lage in bakterielle Zellen einzudringen und dabei kritische physiologische Prozesse zu stören. Auch Buforin 2, das komplett homolog zu Histon H2A ist, scheint in Bakterien intrazelluläre Prozesse, wie die Interaktion mit Nukleinsäuren, anzugreifen (Park, et al. 1998). Buforin 2 dringt in Bakterien *in vivo* (Park, et al. 1998, Park, et al. 2000) und in Lipidvesikel *in vitro* (Kobayashi, et al. 2004) ein, ohne signifikante Membranpermeabilisierungen auszulösen. Außerdem kann Buforin 2 aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften *in vitro* an DNA und RNA binden (Park, et al. 1998, Uytterhoeven, et al. 2008). Aufgrund der Ergebnisse lässt sich die Wirkung der Histone als stamm- und speziesspezifisch zusammenfassen. Gegen die getesteten grampositiven Stämme zeigte sich aber generell eine etwas höhere bakterizide Wirkung.

Bevor die antimikrobiellen Eigenschaften der Histone zum Einsatz kommen können, müssen sie noch vom Nukleus an den Ort des Geschehens transferiert werden. Auch die Bindung der Histone an DNA hemmt ihre antimikrobielle Aktivität (Sol, et al. 2016). Aufgrund der normalen Neubildung der Zelloberfläche kommt es zur Apoptose von Epithelzellen. Die in den Zellen enthaltenen Histone können auf diese Weise freigesetzt werden und sich im Mukus anlagern. Wegen ihrer antimikrobiellen Eigenschaften können sie dort eine Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen spielen. Das Vorkommen der Histone im Mukus konnte durch verschiedene Methoden in dieser Arbeit bestätigt werden. Bei CED kommt es zu typischen Läsionen in der mukosalen Oberfläche, durch die toxische Substanzen eindringen und bakterielle Infektionen verursachen können, die sich dann zu einem Entzündungsgeschehen entwickeln. Die Entzündung des Darms ist außerdem der Grund für die erhöhte Akquirierung von Immunzellen, wie Neutrophile. Sie sind in der Lage durch einen erzwungenen Zelltod, der NETosis, NETs zu entlassen, die vor allem aus DNA, Histonen, neutrophilen Enzymen und bakteriellen Molekülen zusammengesetzt sind

(Brinkmann, et al. 2004, Parseghian und Luhrs 2006, Urban, et al. 2006 und 2009). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten bei MC und CU auch in dieser Arbeit leicht erhöhte H2A- und H2B-Konzentrationen im Mukus gefunden werden, die jedoch statistisch nicht signifikant waren. An dieser Stelle wären weiterführende Versuche von besonderer Wichtigkeit.

4.3 Teil 3 – Antimikrobielle Aktivität rekombinanter Histone

Die Kombination von antimikrobiell aktiven Peptiden oder Proteinen führt häufig zu einer Wechselwirkung untereinander und dadurch zu einer Steigerung der Aktivität, die über den normalen additiven Effekt hinausgeht. So konnte unter anderem eine synergistische Potenzierung durch den kombinierten Einsatz von LL37 mit HBD2 oder HBD3 gegen Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) beobachtet werden (Midorikawa, et al. 2003). Chen et al. zeigten ebenfalls einen Synergismus durch die Kombination von LL37 und HBD2 im sauren Milieu gegen *E. coli* (Chen, et al. 2005). Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die synergistischen Effekte an rekombinanten Histonen bei wichtigen Vertretern der intestinalen Mikrobiota untersucht. Im Folgenden wird der Begriff des Synergismus nur verwendet, wenn die Kombination zweier Stoffe zusammen einen größeren antimikrobiellen Effekt zeigt, als die Aktivität der beiden Peptide zusammen. Dagegen ist die Aktivität zweier Stoffe additiv, wenn der kombinierte Effekt einen höheren Wert erreicht als das stärkste Peptid alleine. Die Bestimmung der geeignetsten Histonvolumina wurde im Vorfeld durch so genannte Checkerboard-Assays ausgetestet, bei denen die Wirksamkeit individueller Komponenten überkreuz mit unterschiedlichen Konzentrationen analysiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da die Abtötung der Einzelkomponenten nicht zu hoch sein darf, um eine synergistische Wirkung erkennen zu können. Aufgrund dieser Arbeit konnte eine ideale Konzentration der Histone von 10 µg/ml bestimmt werden. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Vitalitätstests wurde die antimikrobielle Aktivität der rekombinanten Kernhistone alleine, in Kombination untereinander und in Kombination mit den anderen AMPs HBD1, HBD3 und LL37 untersucht (siehe Abbildung 27). Dabei war eine stammspezifische Steigerung der antimikrobiellen Aktivität der Histone untereinander zu beobachten. Bei

den beiden Stämmen *E. coli* PI 395 und *C. albicans* PI 248 zeigten die Histonkombinationen untereinander synergistische Effekte, bei den Kombinationen mit AMPs traten additive Effekte auf. Eine gegenteilige Wirksamkeit konnte dagegen bei *S. aureus* PI 375 beobachtet werden, da es hier nur bei den Kombinationen von Histonen mit HBD1, HBD3 und LL37 zu synergistischen Effekten kam. Bei drei weiteren Stämmen, *E. coli* PI 868, *B. fragilis* PZ 4046 und PI 288, zeigten sowohl die Histonkombinationen untereinander als auch die Kombinationen mit AMPs additive und synergistische Effekte. Somit konnte bei diesem Versuch eine Steigerung der antimikrobiellen Aktivität der Histone durch ihren kombinierten Einsatz miteinander bzw. durch die Kombination mit AMPs festgestellt werden. Diese antimikrobielle Aktivität erwies sich jedoch als stark stammspezifisch. Hier könnte die Erhöhung der Anzahl untersuchter Stämme pro Spezies zu weiteren Erkenntnissen bezüglich der Aktivität führen. Die synergistischen Effekte der Histone miteinander bzw. in Kombination mit HBD3 konnte ebenfalls durch RDAs bei *S. aureus* ATCC 25923 untermauert werden (siehe Abbildung 30).

Die bisher untersuchten Mikroorganismen geben einen guten Überblick über die Wirkung der Histone gegen die wichtigsten Vertreter der intestinalen Mikrobiota. Vor allem in der Krankenhaushygiene sind nosokomiale Erreger, wie z.B. *C. difficile* im Darm, von großer Bedeutung. Sie stellen besonders bei immungeschwächten Personen ein hohes Risiko dar. Als direktes Resultat der ansteigenden Zahl der nosokomialen Infektionen wird hauptsächlich der vermehrte Einsatz von Breitbandantibiotika gesehen. *C. difficile*, ein sporen- sowie toxinbildendes grampositives Bakterium, das sich im Falle einer gestörten Darmflora ausbreitet und zu schwerer Diarrhoe (CDAD) führen kann, zählt zu den häufigsten Krankenhauskeimen (Venugopal und Johnson 2012). In durchflusszytometrischen Analysen wurde die Wirkung der Histone alleine, in Kombination untereinander und in Kombination mit HBD1, HBD3 und LL37 gegen verschiedene *C. difficile*-Stämme untersucht (siehe Abbildung 28). Dabei zeigten sich bei den Histonkombinationen untereinander und den Kombinationen mit HBD3 und LL37 sehr starke synergistische Effekte gegen alle getesteten Stämme. Bei HBD1 konnte durch einen kombinierten Einsatz (bis auf wenige Ausnahmen) allenfalls additive Wirksamkeit verzeichnet werden.

Bei den durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen und RDAs konnten bei vielen Histon-Histon-Kombinationen bzw. Histon-AMP-Kombinationen schon in sehr geringen Konzentrationen synergistische Effekte nachgewiesen werden. Viele antimikrobiell wirksame Substanzen, wie z.B. Defensine und LL37, führen zum Zusammenbruch der Bakterienzellwand bzw. äußeren Membran (Maisetta, et al. 2003). Daher ist vor allem ein kombinierter Einsatz von Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten in der Zelle sinnvoll: Die AMPs bilden Poren in der Zellhülle der Mikroorganismen und erleichtern so den Histonen das Eindringen in die Zelle.

Während einer Antibiotikatherapie kann es im Darm zu einer übermäßigen Vermehrung von *C. difficile* und der gleichzeitigen Freisetzung der Toxine A und B kommen. Toxin A ist ein Enterotoxin, das schwere Diarrhoe hervorruft und für die Entzündung des Dickdarms verantwortlich ist. Toxin B ist ein membranschädigendes Zytotoxin. Einige neu isolierte Stämme, beispielsweise der Ribotyp 027 (McDonald, et al. 2005, Karas, et al. 2010), zeichnen sich durch eine vermehrte Toxinbildung und damit einhergehend einer höheren Virulenz und Letalität aus. Aus diesem Grund wurde auch der Einfluss der Histone auf die Toxin A/B-Induktion getestet (siehe Abbildung 29). Dabei zeigte sich, dass es durch den Einsatz von Histonen zu keiner Steigerung der Toxinfreisetzung bei den toxinpositiven Stämmen, wie die Patientenisolat 1856, 6504, 7208 und 3331, kommt. Bei den beiden *C. difficile* Patientenisolaten 5397 und 9810 wurden bei synergistischen Wirkungen, wohl aufgrund der Zerstörung der Bakterienzellen, geringfügige Erhöhungen der Toxinmengen beobachtet.

Die Wirkungsweisen der Histone alleine, in Kombination untereinander und mit HBD3 wurden durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bei *E. coli* ATCC 25922 (siehe Abbildung 31) und *C. difficile* 003 (siehe Abbildung 32) genauer visualisiert. Bei *E. coli* ATCC 25922 zeigte sich für alle Kernhistone ein Verlust der Zellintegrität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Bei Histon H3 und H4 alleine wurde bereits jeweils eine hohe Zerstörungsrate erreicht, die durch die Kombination von H2A mit dem Defensin HBD3 nochmals verstärkt werden konnte. Bei *C. difficile* 003 konnte nach der Histon-H3-Behandlung in mikroskopischen Aufnahmen eine deutliche Verklumpung der Bakterien beobachtet werden. Diese Verklumpung konnte

durch den kombinierten Einsatz der beiden Histone H2B und H3 im Vergleich zu H3 alleine nochmals verstärkt werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten nach H3-Behandlung verglichen mit den intakten Kontrollen eine starke Zerstörung der Zellstruktur durch Membranruptur mit gleichzeitigem Austritt der Zellbestandteile. Auch hier konnte eine Steigerung der Zerstörung durch den kombinierten Einsatz von H2B und H3 verzeichnet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die starke antimikrobielle Wirkung der rekombinanten Histone mit der Wirkung der „klassischen AMPs“ vergleichbar ist. Durch einen gezielten kombinierten Einsatz von Kernhistonen miteinander oder mit verschiedenen AMPs konnte die bereits hohe antimikrobielle Aktivität nochmals gesteigert werden. Da sich die Aktivität der Kernhistone nicht auf eine Familie von Mikroorganismen beschränkt, ist ein zukünftiger Einsatz gegen Pathogene, wie z.B. nosokomiale Erreger, vorstellbar.

4.4 Fazit und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle der Histone bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und ihre antimikrobielle Aktivität näher zu untersuchen. Die zu Beginn durchgeführte systematische Analyse von Darmbiopsieextrakten zeigte eine tendenzielle Erhöhung der Genexpression der Kernhistone, die bei H2A und H2B sogar signifikant ausfiel. Aufgrund einer extremen Streuung konnte bei der Proteinexpressionsstärke allerdings keine Signifikanzen oder Tendenzen zwischen Gesunden und CED-Patienten gefunden werden. Im Mukus konnte hingegen eine leichte Erhöhung der Histonproteine H2A und H2B bei CU beobachtet werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen der Kolonhistone aus Mukus, Darmresektaten, und Darmbiopsien ließen ebenfalls kaum Unterschiede in der antimikrobiellen Aktivität zwischen Gesunden und Erkrankten erkennen. Lediglich bei zwei *S. aureus*-Stämmen konnte eine signifikant erhöhte Histonaktivität in entzündetem CU-Gewebe festgestellt werden. Die Wirkung der extrahierten Histone scheint also stammspezifisch zu sein. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Vitalitätstests konnte eine Steigerung der Histonaktivität gegen die unterschiedlichsten Mikroorganismen gezeigt werden. Bei einem kombinierten Einsatz der Histone miteinander bzw. mit

anderen antimikrobiell aktiven Peptiden waren häufig synergistische Effekte zu beobachten. Diese Ergebnisse konnten durch RDA-Analysen bestätigt werden, die ebenfalls einen Synergismus zeigten. Elektromikroskopische Aufnahmen konnten zusätzlich die Wirkungsweise der Histone gegen verschiedene Bakterien visualisieren und eine Verklumpung der Bakterien sowie einen massiven Verlust der Zellintegrität belegen.

Normalerweise führt die natürliche Desquamation der intestinalen Epithelzellen zu einer Anreicherung des Mukus mit frei werdenden Histonen, die aufgrund ihrer starken antimikrobiellen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen spielen könnten. Bei CED kommt es dagegen zu Läsionen in der mukosalen Oberfläche, durch die Bakterien und deren Produkte eindringen können und Infektionen verursachen. Als Folge werden Immunzellen akquiriert, die zusätzlich Histone freisetzen. Die abnormale Abschilferung von Zellen in entzündetem MC-Gewebe muss folglich ausgeglichen werden. Aus diesem Grund kommt es bei MC-Patienten zu einer Hochregulierung der Kernhistongenexpression. Die Histonproteine werden aufgrund des hohen Zellumsatzes freigesetzt und wandern in den Mukus. Dadurch bleibt der Proteinlevel der Histone in der Mukosa ungefähr gleich. Dieser Prozess konnte anhand der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten bestätigt werden. Bei der Bewertung der vorliegenden Ergebnisse muss allerdings die geringe Probenanzahl beachtet werden, die zu einer extremen Streuung der Proteinexpressionsergebnisse führte. Durch eine Vergrößerung des Kollektivs könnten belastbarere Werte ermittelt werden. Veränderungen der antimikrobiellen Histonaktivität hätten ebenfalls als pathologischer Defekt bei CED gewertet werden können. Solch ein Effekt konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die untersuchten Histone scheinen keinen Einfluss auf eine CED-Entwicklung zu haben. Aufgrund ihrer antimikrobiellen Aktivität spielen Histone aber eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen im Kolon.

Vor dem Hintergrund der stetig steigenden Anzahl multiresistenter Erreger sind Neuentwicklungen antimikrobiell wirksamer Substanzen besonders wichtig. Das therapeutische Potenzial der Histone und ihr möglicher Einsatz als neue Antibiotika, müssen weiterführende Studien prüfen. Die vorliegende Arbeit konnte das große

Potenzial der Histone gegen die verschiedensten Erreger bestätigen. Ein bislang ungenutztes Potenzial, das mit dem der klassischen AMPs durchaus vergleichbar ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit dürften also sicher Anregungen für nachfolgende Studien bieten.

5 Literaturverzeichnis

- Aarbiou, J., et al. „Neutrophil Defensins Enhance Lung Epithelial Wound Closure and Mucin Gene Expression in Vitro.“ *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30 (2), 2004: 193-201.
- Aarbiou, J., et al. „Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 72 (1), 2002a: 167-174.
- Aarbiou, J., K. F. Rabe, und P. S. Hiemstra. „Role of defensins in inflammatory lung disease.“ *Annals of Medicine*, 34 (2), 2002b: 96-101.
- Abraham, N., W. Selby, R. Lazarus, und M. Solomon. „Smoking and Ulcerative colitis - Is smoking an indirect risk factor for the development of ulcerative colitis? An age- and sex-matched case-control study.“ *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18 (2), 2003: 139-146.
- Aerts, A. M., I. E. J. A. Francois, B. P. A. Cammue, und K. Thevissen. „The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins.“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (13), 2008: 2069-2079.
- Agerberth, B., et al. „The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations.“ *Blood*, 96 (9), 2000: 3086-3093.
- Agerberth, B., H. Gunne, J. Odeberg, P. Kogner, H. G. Boman, und G. H. Gudmundsson. „FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92 (1), 1995: 195-199.
- Allam, R., M. N. Darisipudi, J. Tschopp, und H.-J. Anders. „Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome.“ *European Journal of Immunology*, 43, 2013: 3336-3342.
- Anderson, C. A., et al. „Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47.“ *Nature Genetics*, 43 (3), 2011: 246-252.

- Andoh, A., et al. „Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis.“ *Journal of Gastroenterology*, 46 (4), 2011: 479-486.
- Antoni, L. „Die intestinale Mukusschicht als antimikrobielle Barriere.“ *Dissertation, Fakultät Naturwissenschaften, Universität Hohenheim, Stuttgart, 2012.*
- Antoni, L., et al. „Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides.“ *Journal of Crohn's and Colitis*, 7, 2013: e652-e664.
- Antoni, L., S. Nuding, J. Wehkamp, und E. F. Stange. „Intestinal barrier in inflammatory bowel disease.“ *World Journal of Gastroenterology*, 20 (5), 2014: 1165-1179.
- Bals, R., D. J. Weiner, R. L. Meegalla, und J. M. Wilson. „Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model.“ *Journal of Clinical Investigation*, 103 (8), 1999: 1113-1117.
- Bals, R., und J. M. Wilson. „Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides.“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60 (4), 2003: 711-720.
- Bals, R., X. Wang, M. Zasloff, und J. M. Wilson. „The peptide antibiotic LL-37yhCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface.“ *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 95 (16), 1998: 9541-9545.
- Banáth, J. P., S. H. MacPhail, und P. L. Olive. „Radiation Sensitivity, H2AX Phosphorylation, and Kinetics of Repair of DNA Strand Breaks in Irradiated Cervical Cancer Cell Lines.“ *Cancer Research*, 64 (19), 2004: 7144-7149.
- Bannister, A. J., und T. Kouzarides. „Regulation of chromatin by histone modifications.“ *Cell Research*, 21, 2011: 381-395.
- Barrett, J. C., et al. „Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease.“ *Nature genetics*, 40 (7), 2008: 955-962.
- Baumgart, D. C. „Diagnostik und Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.“ *Deutsches Ärzteblatt*, 106 (8), 2009: 123-133.
- Bentley, R. W., et al. „Association of Higher DEFB4 Genomic Copy Number With Crohn's Disease.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 105 (2), 2010: 354-359.

- Bernstein, C. N., et al. „The Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in Canada: A Population-Based Study.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 101, 2006: 1559-1568.
- Bernstein, C. N., J. F. Blanchard, P. Rawsthorne, und N. Yu. „The Prevalence of Extraintestinal Diseases in Inflammatory Bowel Disease: A population-based Study.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 96 (4), 2001: 1116-1122.
- Bernstein, C. N., und F. Shanahan. „Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases.“ *Gut*, 57, 2008: 1185-1191.
- Bevins, C. L. „Antimicrobial Peptides as Effector Molecules of Mammalian Host Defense.“ *Contributions to Microbiology Basel, Karger*, 10, 2003: 106-148.
- Bevins, C. L., und N. H. Salzman. „Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis.“ *Nature Reviews Microbiology*, 9, 2011: 356-368.
- Biancone, L., et al. „European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Special situations.“ *Journal of Crohn's and Colitis*, 2, 2008: 63-92.
- Birkemo, G. A., D. Mantzilas, T. Lüders, I. F. Nes, und J. Nissen-Meyer. „Identification and structural analysis of the antimicrobial domain in hipposin, a 51-mer antimicrobial peptide isolated from Atlantic halibut.“ *Biochimica et Biophysica Acta*, 1699, 2004: 221-227.
- Birkemo, G. A., T. Lüders, O. Andersen, I. F. Nes, und J. Nissen-Meyer. „Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.).“ *Biochimica et Biophysica Acta*, 1646, 2003: 207-2015.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, und T. P. Salarzar-Mather. „NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines.“ *Annual Reviews of Immunology*, 17, 1999: 189-202.
- Birtwistle, J. „The role of cigarettes and nicotine in the onset and treatment of ulcerative colitis.“ *Postgraduate Medical Journal*, 72 (854), 1996: 714-718.

- Bloom, K. S., und J. N. Anderson. „Fractionation and Characterization of Chromosomal Proteins by the Hydroxyapatite Dissociation Method.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 258 (12), 1978: 4446-4450.
- Bradford, M. M. „A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.“ *Analytical Biochemistry*, 72, 1976: 248-254.
- Braff, M. H., et al. „Structure-Function Relationships among Human Cathelicidin Peptides: Dissociation of Antimicrobial Properties from Host Immunostimulatory Activities.“ *The Journal of Immunology*, 174 (7), 2005: 4271-4278.
- Brand, S. „Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease.“ *Gut*, 58 (8), 2009: 1152-1167.
- Brinkmann, V., et al. „Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria.“ *Science*, 303, 2004: 1532-1535.
- Brockus, C. W., M. W. Jackwood, und B. G. Harmon. „Characterization of p-defensin prepropeptide mRNA from chicken and turkey bone marrow.“ *Animal Genetics*, 29 (4), 1998: 283-289.
- Browning, C. H., G. T. Morgan, J. V. M. Robb, und L. P. Walls. „The trypanocidal action of certain phenanthridinium compounds.“ *Journal of Pathology and Bacteriology*, 46 (1), 1938: 203-204.
- Cadwell, K., et al. „A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16/1 in mouse and human intestinal Paneth cells.“ *Nature*, 456 (7219), 2008: 259-263.
- Caprilli, R., et al. „European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations.“ *Gut*, 55 (Supplement 1), 2006: i36-i58.
- Cederlund, A., G. H. Gudmundsson, und B. Agerberth. „Antimicrobial peptides important in innate immunity.“ *The FEBS Journal*, 278 (20), 2011: 3942-3951.
- Chaput, C., und A. Zychlinsky. „Sepsis: the dark side of histones.“ *Nature Medicine*, 15 (11), 2009: 1245-1246.

- Chen, X., et al. „Synergistic effect of antibacterial agents human b-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.“ *Journal of Dermatologic Science*, 40, 2005: 123-132.
- Cheng, J.-F., Y.-J. Ning, W. Zhang, Z.-H. Lu, und L. Lin. „T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: A meta-analysis.“ *World Journal of Gastroenterology*, 16 (10), 2010: 1258-1266.
- Cho, J. H., B. H. Sung, und S. C. Kim. „Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach.“ *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 2008: 1564-1569.
- Chuammitri, P., J. Ostojic, C. B. Andreasen, S. B. Redmond, S. J. Lamont, und D. Palic. „Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils.“ *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129, 2009: 126-131.
- Cole, A. M., et al. „Retrocyclin: A primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1.“ *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99 (4), 2002: 1813-1818.
- Cooney, R., et al. „NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation.“ *Nature Medicine*, 16 (1), 2010: 90-97.
- Cosnes, J., C. Gower-Rousseau, P. Seksik, und A. Cortot. „Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Disease.“ *Gastroenterology*, 140, 2011: 1785-1794.
- Cowland, J. B., A. H. Johnson, und N. Borregaard. „hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules.“ *FEBS Letters*, 368, 1995: 173-176.
- Daher, K. A., R. I. Lehrer, T. Ganz, und M. Kronenberg. „Isolation and characterization of human defensin cDNA clones.“ *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 85 (19), 1988: 7327-7331.
- Davey, C. A., D. F. Sargent, K. Luger, A. Maeder, und T. J. Richmond. „Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1,9 Å Resolution.“ *Journal of Molecular Biology*, 319, 2002: 1097-1113.

- De Bie, C., et al. „Smoking behaviour and knowledge of the health effects of smoking in patients with inflammatory bowel disease.“ *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 42, 2015: 1294-1302.
- De Silva, H. J., N. R. De Silva, A. P. De Silva, und D. P. Jewell. „Emergence of Inflammatory Bowel Disease 'Beyond the West': Do prosperity and improved hygiene have a role?“ *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 2008: 857-860.
- Devlen, J., K. Beusterien, L. Yen, A. Ahmed, A. S. Cheifetz, und A. C. Moss. „The Burden of Inflammatory Bowel Disease: A Patient-reported Qualitative Analysis and Development of a Conceptual Model.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 20 (3), 2014: 545-552.
- Dharmani, P., V. Srivastava, V. Kissoon-Singh, und K. Chadee. „Role of Intestinal Mucins in Innate Host Defense Mechanisms against Pathogens.“ *Journal of Innate Immunity*, 1 (2), 2009: 123-135.
- Di Nardo, A., A. Vitiello, und R. L. Gallo. „Cutting Edge: Mast Cell Antimicrobial Activity Is Mediated by Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide.“ *The Journal of Immunology*, 170 (5), 2003: 2274-2278.
- Dignass, A. U. „Mechanisms and Modulation of Intestinal Epithelial Repair.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 7 (1), 2001: 68-77.
- Dorigo, B., T. Schalch, K. Bystricky, und T. J. Richmond. „Chromatin Fiber Folding: Requirement for the Histone H4 N-terminal Tail.“ *Journal of Molecular Biology*, 327 (1), 2003: 85-96.
- Dorrington, T., L. Villamil, und M. Gómez-Chiarri. „Upregulation in response to infection and antibacterial activity of oyster histone h4.“ *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 2011: 94-101.
- Dorschner, R. A., et al. „Cutaneous Injury Induces the Release of Cathelicidin Antimicrobial Peptides Active Against Group A Streptococcus.“ *Journal of Investigative Dermatology*, 117 (1), 2001: 91-97.
- Draizen, E. J., A. K. Shaytan, L. Marino-Ramirez, R. D. Talbert, D. Landsman, und A. R. Panchenko. „HistoneDB 2.0: a histone database with variants - an

- integrated resource to explore histones and their variants." *Database*, PMID: 26989147 2016.
- D'Souza, S., et al. „Dietary Patterns and Risk for Crohn's Disease in Children." *Inflammatory Bowel Disease*, 14 (3), 2008: 367-373.
- Duerr, R. H., et al. „A Genome-wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene." *Science*, 314, 2006: 1461-1463.
- Duits, L. A., B. Ravensbergen, M. Rademaker, P. S. Hiemstra, und P. H. Nibbering. „Expression of b-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells." *Immunology*, 106 (4), 2002: 517-525.
- Eckburg, P. B., et al. „Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora." *Science*, 308 (5728), 2005: 1635-1638.
- Eckburg, P. B., und D. A. Relman. „The Role of Microbes in Crohn's Disease." *Clinical infectious Disease*, 44 (2), 2007: 256-262.
- Elphick, D., S. Liddell, und Y. R. Mahida. „Impaired Luminal Processing of Human Defensin-5 in Crohn's Disease." *The American Journal of Pathology*, 172 (3), 2008: 702-713.
- Endl, J., H. P. Seidl, F. Fiedler, und K. H. Schleifer. „Chemical composition and structure of cell wall teichoic acids of staphylococci." *Archives of Microbiology*, 135 (3), 1983: 215-223.
- Eslami-Mossallam, B., H. Schiessel, und J. Van Noort. „Nucleosome dynamics: Sequence matters." *Advances in Colloid and Interface Science*, CIS-01620, Article in Press, 2016.
- Fahlgren, A., S. Hammarström, A. Danielsson, und M.-L. Hammarström. „b-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis." *Clinical and Experimental Immunology*, 137 (2), 2004: 379-385.
- Fahlgren, A., et al. „Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis." *Clinical and Experimental Immunology*, 131 (1), 2003: 90-101.
- Fava, F., und S. Danese. „Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend or foe?" *World Journal of Gastroenterology*, 17 (5), 2011: 557-566.

- Feagan, B. G., W. J. Sandborn, S. Hass, T. Niecko, und J. White. „Health-Related Quality of Life During Natalizumab Maintenance Therapy for Crohn's disease.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 102 (12), 2007: 2737-2746.
- Fellermann, K., et al. „A Chromosome 8 Gene-Cluster Polymorphism with Low Human Beta-Defensin 2 Gene Copy Number Predisposes to Crohn Disease of the Colon.“ *The American Journal of Human Genetics*, 79 (3), 2006: 439-448.
- Feng, Z., G. R. Dubyak, M. M. Lederman, und A. Weinberg. „Cutting Edge: Human b-Defensin 3—A Novel Antagonist of the HIV-1 Coreceptor CXCR4.“ *Journal of Immunology*, 177 (2), 2006: 782-786.
- Finch, J. T., et al. „Structure of nucleosome core particles of chromatin.“ *Nature*, 269, 1977: 29-36.
- Frank, D. N., A. L. S. Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz, und N. R. Pace. „Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104 (34), 2007: 13780-13785.
- Fredericq, E. „Interactions DNA-proteines et structure de la chromatine.“ *Biochimie*, 58 (8), 1976: 961-969.
- Frohman, M., et al. „The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (24), 1997: 15258-15263.
- Fuchs, T. A., et al. „Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.“ *The Journal of Cell Biology*, 176 (2), 2007: 231-241.
- Fukata, M., und M. T. Abreu. „Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut.“ *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 2009: 680-687.
- Galasinski, S. C., K. A. Resing, und N. G. Ahn. „Protein mass analysis of histones.“ *Methods*, 31, 2003: 3-11.
- Ganz, T. „Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity.“ *Nature Reviews Immunology*, 3 (9), 2003: 710-720.
- Ganz, T., M. E. Selsted, und R. I. Lehrer. „Defensins.“ *European Journal of Haematology*, 44, 1990: 1-8.

- Ganz, T., und R. I. Lehrer. „Antimicrobial peptides of vertebrates.“ *Current Opinion in Immunology*, 10, 1998: 41-44.
- García, J.-R. C., et al. „Human b-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity.“ *FASEB Journal*, 15 (10), 2001: 1819-1821.
- Gasche, C., et al. „A simple Classification of Crohn's Disease: Report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 6 (1), 2000: 8-15.
- Gennaro, R., und M. Zanetti. „Structural Features and Biological Activities of the Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptides.“ *Biopolymers*, 55 (1), 2000: 31-49.
- Gersemann, M., E. F. Stange, und J. Wehkamp. „From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases.“ *World Journal of Gastroenterology*, 17 (27), 2011: 3198-3203.
- Gersemann, M., et al. „Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis.“ *Differentiation*, 77, 2009: 84-94.
- Ghosh, S. K., T. A. Gerken, K. M. Schneider, Z. Feng, T. S. McCormick, und A. Weinberg. „Quantification of Human b-Defensin-2 and -3 in Body Fluids: Application for Studies of Innate Immunity.“ *Clinical Chemistry*, 53 (4), 2007: 757-765.
- Ginsburg, I., R. S. Mitra, D. F. Gibbs, J. Varani, und R. Kohen. „Killing of endothelial cells and release of arachidonic acid - Synergistic effects among Hydrogen Peroxide, Membrane-damaging Agents, Cationic Substances, and Proteinases and their Modulation by Inhibitors.“ *Inflammation*, 17 (3), 1993: 295-319.
- Goto, Y., und H. Kiyono. „Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system.“ *Immunological Reviews*, 245, 2012: 147-163.
- Gough, M., R. E. W. Hancock, und N. M. Kelly. „Antiendotoxin Activity of Cationic Peptide Antimicrobial Agents.“ *Infection and Immunity*, 64 (12), 1996: 4922-4927.

- Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams, und M. Gerstein. „Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genome scale.“ *Genome Biology*, 4 (9), 2003: Article 117.
- Grinberg, N., S. Elazar, I. Rosenshine, und N. Y. Shpigel. „b-Hydroxybutyrate Abrogates Formation of Bovine Neutrophil Extracellular Traps and Bactericidal Activity against Mammary Pathogenic Escherichia coli.“ *Infection and Immunity*, 76 (6), 2008: 2802-2807.
- Groschwitz, K. R., und S. P. Hogan. „Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis.“ *Clinical reviews in allergy and immunology*, 124 (1), 2009: 3-20.
- Guaní-Guerra, E., T. Santos-Mendoza, S. O. Lugo-Reyes, und L. M. Terán. „Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease.“ *Clinical Immunology*, 135 (1), 2010: 1-11.
- Gudmundsson, G. H., B. Agerberth, J. Odeberg, T. Bergman, B. Olsson, und R. Salcedo. „The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes.“ *European Journal of Biochemistry*, 238, 1996: 325-332.
- Gupta, A. K., et al. „Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death.“ *FEBS Letters*, 584, 2010: 3193-3197.
- Ha, F., und H. Khalil. „Crohn's disease: a clinical update.“ *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 8 (6), 2015: 352-359.
- Hakansson, A., und G. Molin. „Gut Microbiota and Inflammation.“ *Nutrients*, 3, 2011: 637-682.
- Hale, J. D. F., und R. E. W. Hancock. „Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria.“ *Expert Reviews of Anti-infectious Therapy*, 5 (6), 2007: 951-959.
- Hampe, J., et al. „A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1.“ *Nature genetics*, 39 (2), 2007: 207-211.

- Harder, J., et al. „Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF α , and IL-1 β , but Not IL-6, Induce Human β -Defensin-2 in Respiratory Epithelia.“ *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22, 2000: 714-721.
- Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, und J.-M. Schröder. „Isolation and Characterization of Human β -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (8), 2001: 5707-5713.
- Harwig, S. S. L., A. S. K. Park, und R. I. Lehrer. „Characterization of Defensin Precursors in Mature Human Neutrophils.“ *Blood*, 79, 1992: 1532-1537.
- Harwig, S. S. L., et al. „Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes.“ *FEBS Letters*, 342 (3), 1994: 283-289.
- Hase, K., L. Eckmann, J. D. Leopard, N. Varki, und M. F. Kagnoff. „Cell Differentiation is a Key Determinant of Cathelicidin LL-37/Human Cationic Antimicrobial Protein 18 Expression by Human Colon Epithelium.“ *Infection and Immunity*, 70 (2), 2002: 953-963.
- Hawes, M. C., G. Curlango-Rivera, F. Wen, G. J. White, H. D. VanEtten, und Z. Xiong. „Extracellular DNA: The tip of root defenses?“ *Plant Science*, 180, 2011: 741-745.
- Hayashi, H., M. Sakamoto, und Y. Benno. „Phylogenetic Analysis of the Human Gut Microbiota Using 16S rDNA Clone Libraries and Strictly Anaerobic Culture-Based Methods.“ *Microbiology and Immunology*, 46 (8), 2002: 535-548.
- Hazlett, L., und M. Wu. „Defensins in innate immunity.“ *Cell and Tissue Research*, 343 (1), 2011: 175-188.
- Heilborn, J. D., et al. „The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 is Involved in Re-Epithelialization of Human Skin Wounds and is Lacking in Chronic Ulcer Epithelium.“ *Journal of Investigative Dermatology*, 120 (3), 2003: 379-389.
- Hiemstra, P. S., M. T. van den Barselaar, M. Roest, P. H. Nibbering, und R. van Furth. „Ubiquicidin, a novel murine microbicidal protein present in the cytosolic fraction of macrophages.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 66, 1999: 423-428.
- Hirsch, J. G. „Bactericidal Action of Histone.“ *Journal of Experimental Medicine*, 108, 1958: 925-944.

- Hold, G. L., S. E. Pryde, V. J. Russel, E. Furrrie, und H. J. Flint. „Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis.“ *FEMS Microbiology Ecology*, 39 (1), 2002: 33-39.
- Hollox, E. J., J. A. L. Armour, und J. C. K. Barber. „Extensive Normal Copy Number Variation of a b-Defensin Antimicrobial-Gene Cluster.“ *The American Journal of Human Genetics*, 73, 2003: 591-600.
- Hooper, L. V. „Do symbiotic bacteria subvert host immunity?“ *Nature Reviews Microbiology*, 7, 2009: 367-374.
- Hooper, L. V., und J. I. Gordon. „Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut.“ *Science*, 292, 2001: 1115-1118.
- Hou, J. K., H. El-Serag, und S. Thirumurthi. „Distribution and Manifestations of Inflammatory Bowel Disease in Asians, Hispanics, and African Americans: A Systematic Review.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 104, 2009: 2100-2109.
- Hou, W., et al. „Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity.“ *Cell Death and Disease*, 4 (12), 2013: e966.
- Howell, S. J., D. Wilk, S. P. Yadav, und C. L. Bevins. „Antimicrobial polypeptides of the human colonic epithelium.“ *Peptides*, 24, 2003: 1763-1770.
- Huang, H., et al. „Endogenous Histones Function as Alarmins in Sterile Inflammatory Liver Injury Through Toll-like Receptor 9 in Mice.“ *Hepatology*, 54 (3), 2011: 999-1007.
- Hviid, A., H. Svanström, und M. Frisch. „Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood.“ *Gut*, 60, 2011: 49-54.
- Hyde, A. J., J. Parisot, A. McNichol, und B. B. Bonev. „Nisin-induced changes in Bacillus morphology suggest a paradigm of antibiotic action.“ *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103 (52), 2006: 19896-19901.
- Imielinski, M., et al. „Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease.“ *Nature genetics*, 41 (12), 2009: 1335-1340.
- Islam, D., et al. „Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: A novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator.“ *Nature Medicine*, 7 (2), 2001: 180-185.

- Iwasaki, W., et al. „Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes.“ *FEBS Open Bio*, 3, 2013: 363-369.
- Jäger, S., E. F. Stange, und J. Wehkamp. „Antimicrobial Peptides in Gastrointestinal Inflammation.“ *International Journal of Inflammation*, Article ID 910283, 2010: 1-11.
- Jenssen, H., P. Hamill, und E. W. Hancock. „Peptide Antimicrobial Agents.“ *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (3), 2006: 491-511.
- Johansson, M. E. V., J. M. Holmén-Larsson, und G. C. Hansson. „The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions.“ *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 108 (Supplement 1), 2011: 4659-4665.
- Johansson, M. E. V., M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm, und G. C. Hansson. „The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105 (39), 2008: 15064-15069.
- Jones, D. T., M. T. Osterman, M. Bewtra, und J. D. Lewis. „Passive Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 103 (9), 2008: 2382-2393.
- Joossens, M., et al. "Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives." *Gut*, 60 (5), 2011: 631-637.
- Jose, F. A., et al. „Development of Extraintestinal Manifestations in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 15 (1), 2009: 63-68.
- Kagnoff, M. F., und L. Eckmann. „Epithelial Cells as Sensors for Microbial Infection.“ *The Journal of Clinical Infection*, 100 (1), 1997: 6-10.
- Kammermeier, J., M.-A. Morris, V. Garrick, M. Furman, A. Rodrigues, und R. K. Russell. „Management of Crohn's Disease.“ *Archives of Disease in Childhood*, 0, 2015: 1-6.
- Karas, J. A., D. A. Enoch, und S. H. Aliyu. „A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection.“ *Journal of Infection*, 61 (1), 2010: 1-8.

- Kawasaki, H., T. Isaacson, S. Iwamuro, und J. M. Conlon. „A protein with antimicrobial activity in the skin of Schlegel's green tree frog *Rhacophorus schlegelii* (Rhacophoridae) identified as histone H2B.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312, 2003: 1082-1086.
- Khare, S. P., A. Sharma, K. K. Deodhar, und S. Gupta. „Overexpression of histone variant H2A.1 and cellular transformation are related in N-nitrosodiethylamine-induced sequential hepatocarcinogenesis.“ *Experimental Biology and Medicine*, 236, 2011: 30-35.
- Kim, H. S., et al. „Pepsin-Mediated Processing of the Cytoplasmic Histone H2A to Strong Antimicrobial Peptide Buforin I.“ *The Journal of Immunology*, 165, 2000: 3268-3274.
- Kim, Y. S., und S. B. Ho. „Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress.“ *Current Gastroenterology Reports*, 12, 2010: 319-330.
- Kirikae, T., et al. „Protective Effects of a Human 18-Kilodalton Cationic Antimicrobial Protein (CAP18)-Derived Peptide against Murine Endotoxemia.“ *Infection and Immunity*, 66 (5), 1998: 1861-1868.
- Klotman, M. E., und T. L. Chang. „Defensins in innate antiviral immunity.“ *Nature Reviews Immunology*, 6 (6), 2006: 447-456.
- Klug, A., und L. C. Lutter. „The helical periodicity of DNA on the nucleosome.“ *Nucleic Acids Research*, 9 (17), 1981: 4267-4283.
- Kobayashi, S., et al. „Membrane Translocation Mechanism of the Antimicrobial Peptide Buforin 2.“ *Biochemistry*, 43, 2004: 15610-15616.
- Koczulla, R., et al. „An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18.“ *Journal of Clinical Investigation*, 111 (11), 2003: 1665-1672.
- Koslowski, M. J., J. Beisner, E. F. Stange, und J. Wehkamp. „Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease.“ *International Journal of Medical Microbiology*, 300 (1), 2010: 34-40.
- Kragol, G., S. Lovas, G. Varadi, B. A. Condie, R. Hoffmann, und L. Jr. Otvos . „The antibacterial peptide pyrrolicorcin inhibits the ATPase action of DnaK and

- prevents chaperone-assisted protein folding." *Biochemistry*, 40 (10), 2001: 3016-3026.
- Kübler, I., E. F. Stange, K. Fellermann, und J. Wehkamp. „Defensine: körpereigene Antibiotika als zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems.“ *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 131 (36), 2006: 491-511.
- Kurosaka, K., Q. Chen, F. Yarovinsky, J. J. Oppenheim, und D. Yang. „Mouse Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Chemoattracts Leukocytes Using Formyl Peptide Receptor-Like 1/Mouse Formyl Peptide Receptor-Like 2 as the Receptor and Acts as an Immune Adjuvant.“ *The Journal of Immunology*, 174 (10), 2005: 6257-6265.
- Langendijk, P. S., et al. „Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization of Bifidobacterium spp. with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes and Its Application in Fecal Samples.“ *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (8), 1995: 3069-3075.
- Larrick, J. W., et al. „A Novel Granulocyte-Derived Peptide with Lipopolysaccharide-Neutralizing Activity.“ *The Journal of Immunology*, 152 (1), 1994: 231-240.
- Lee, D. G., et al. „HP (2-20) Derived from the Amino Terminal Region of Helicobacter pylori Ribosomal Protein L1 exerts its Antifungal Effects by Damaging the Plasma Membranes of Candida albicans.“ *Journal of Peptide Science*, 8 (8), 2002: 453-460.
- Lehrer, R. I. „Primate Defensins.“ *Nature Reviews Microbiology*, 2 (9), 2004: 727-738.
- Lehrer, R. I., M. Rosenman, S. S. S. L. Harwig, R. Jackson, und P. Eisenhauer. „Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides.“ *Journal of immunological Methods*, 137, 1991b: 167-173.
- Lehrer, R. I., T. Ganz, und M. E. Selsted. „Endogenous Antibiotic Peptides of Animal Cells.“ *Cell*, 64, 1991a: 229-230.
- Lehrer, R. I., und T. Ganz. „Defensins of vertebrate animals.“ *Current Opinion of Immunology*, 14, 2002: 96-102.
- Levine, A., et al. „ESPGHAN Revised Porto Criteria for the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents.“ *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 58 (6), 2014: 795-806.

- Li, G., und D. Reinberg. „Chromatin higher-order structures and gene regulation.“ *Current Opinion in Genetics and Development*, 21, 2011: 175-186.
- Lidar, M., P. Langevitz, und Y. Schoenfeld. „The Role of Infection in Inflammatory Bowel Disease: Initiation, Exacerbation and Protection.“ *The Israel Medical Association Journal*, 11 (9), 2009: 558-563.
- Lindner, H., W. Helliger, und B. Puschendorf. „Histone Separation by High-Performance Liquid Chromatography on C4 Reverse-Phase Columns.“ *Analytical Biochemistry*, 158, 1986: 424-430.
- Liu, J. Z., et al. „Association analysis identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across population.“ *Nature Genetics*, 47 (9), 2015: 979-986.
- Loftus, C. G., et al. „Update on the Incidence and Prevalence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in Olmsted County, Minnesota. 1940-2000.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 13 (3), 2007: 254-261.
- Loftus, E. V., et al. „Effects of Adalimumab Maintenance Therapy on Health-Related Quality of Life of Patients with Crohn's Disease: Patient-Reported Outcomes of the CHARM Trial.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 103 (12), 2008: 3132-3141.
- Lüders, T., G. A. Birkemo, J. Nissen-Meyer, O. Andersen, und I. F. Nes. „Proline Conformation-Dependent Antimicrobial Activity of a Proline-Rich Histone H1 N-Terminal Peptide Fragment Isolated from the Skin Mucus of Atlantic Salmon.“ *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (6), 2005: 2399-2406.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, und T. J. Richmond. „Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.“ *Nature*, 389 (6648), 1997: 251-260.
- Mack, D. R. „Probiotics in Inflammatory Bowel Diseases and Associated Conditions.“ *Nutrients*, 3 (2), 2011: 245-264.
- Macpherson, A. J., und T. Uhr. „Compartmentalization of the Mucosal Immune Responses to Commensal Intestinal Bacteria.“ *Annals of the New York Academy of Science*, 1029, 2004: 36-43.

- Mahmud, N., und D. G. Weir. „The urban diet and Crohn's disease: is there a relationship?“ *European Journal of Gastroenterology*, 13 (2), 2001: 93-95.
- Maisetta, G., et al. „Activity of Human α -Defensin 3 Alone or Combined with Other Antimicrobial Agents against Oral Bacteria.“ *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (10), 2003: 3349-3351.
- Makde, R. D., J. R. England, H. P. Yennawar, und S. Tan. „Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle.“ *Nature*, 467, 2010: 562-567.
- Mallow, E. B., et al. „Human Enteric Defensins.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (8), 1996: 4038-4045.
- Marchesi, J. R., et al. „Rapid and Noninvasive Metabonomic Characterization of Inflammatory Bowel Disease.“ *Journal of Proteome Research*, 6, 2007: 546-551.
- Martin, E., T. Ganz, und R. I. Lehrer. „Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 58 (2), 1995: 128-136.
- Martinez, C., et al. „Unstable Composition of the Fecal Microbiota in Ulcerative Colitis during Clinical Remission.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 103 (3), 2008: 643-648.
- Martinez-Medina, M., X. Aldeguer, F. Gonzalez-Huix, D. Acero, und J. Garcia-Gil. „Abnormal Microbiota Composition in the Ileocolonic Mucosa of Crohn's Disease Patients as Revealed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 12 (12), 2006: 1136-1145.
- Maurice, M. M., et al. „Expression of the Thioredoxin-Thioredoxin Reductase System in the Inflamed Joints of Patients with Rheumatoid Arthritis.“ *Arthritis and Rheumatism*, 42 (11), 1999: 2430-2439.
- McBryant, S. J., et al. „Determinants of Histone H4 N-terminal Domain Function during Nucleosomal Array Oligomerization.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (25), 2009: 16716-16722.
- McDonald, L. C., et al. „An Epidemic, Toxin Gene-Variant Strain of *Clostridium difficile*.“ *The New England Journal of Medicine*, 353 (23), 2005: 2433-2441.

- McGovern, D. P. B., et al. „Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci.“ *Nature genetics*, 42 (4), 2010: 332-337.
- McGovern, D. P. B., S. Kugathasan, und J. H. Cho. „Genetics in Inflammatory Bowel Disease.“ *Gastroenterology*, 149 (5), 2015: 1163-1176.
- McGuckin, M. A., R. Eri, L. A. Simms, T. H. J. Florin, und G. Radford-Smith. „Intestinal Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Diseases.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 15 (1), 2009: 100-113.
- McGuckin, M. A., S. K. Lindén, P. Sutton, und T. H. Florin. „Mucin dynamics and enteric pathogens.“ *Nature Reviews Microbiology*, 9, 2011: 265-278.
- Michaelson, D., J. Rayner, M. Couto, und T. Ganz. „Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity?“ *Journal of Leukocyte Biology*, 51, 1992: 634-639.
- Midorikawa, K., et al. „Staphylococcus aureus Susceptibility to Innate Antimicrobial Peptides, b-Defensins and CAP18, Expressed by Human Keratinocytes.“ *Infection and Immunity*, 71 (7), 2003: 3730-3739.
- Miller, B. F., R. Abrams, A. Dorfman, und M. Klein. „Antibacterial Properties of Protamine and Histone.“ *Science*, 96; 1942: 428-430.
- Molodecky, N. A., et al. „Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases with Time, Based on Systematic Review.“ *Gastroenterology*, 142, 2012: 46-54.
- Mukherjee, S., S. Vaishnava, und L. V. Hooper. „Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense.“ *Cellular and Molecular Life Science*, 65 (19), 2008: 3019-3027.
- Müller, C. A., I. B. Autenrieth, und A. Peschel. „Innate defenses of the intestinal epithelial barrier.“ *Cellular and Molecular Life Science*, 62 (12), 2005: 1297-1307.
- Murphy, C. J., B. A. Foster, M. J. Mannis, M. E. Selsted, und T. W. Reid. „Defensins Are Mitogenic for Epithelial Cells and Fibroblasts.“ *Journal of Cellular Physiology*, 155 (2), 1993: 408-413.
- Nagelkerke, A., et al. „Constitutive expression of d-H2AX has prognostic relevance in triple negative breast cancer.“ *Radiotherapy and Oncology*, 101 (1), 2011: 39-45.

- Naldi, M., et al. „Histone proteins determined in a human colon cancer by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry.“ *Journal of Chromatography*, 1129, 2006: 73-81.
- Nevalainen, T. J., J. M. Grönroos, und M. Kallajoki. „Expression of group II phospholipase A2 in the human gastrointestinal tract.“ *Laboratory Investigation*, 72 (2), 1995: 201-208.
- Ng, S. C., et al. „Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease.“ *Gut*, 62, 2013: 630-649.
- Nguyen, T. X., A. M. Cole, und R. I. Lehrer. „Evolution of primate th-defensins: a serpentine path to a sweet tooth.“ *Peptides*, 24 (11), 2003: 1647-1654.
- Nicholson, P., und B. Müller. „Post-transcriptional control of animal histone gene expression – not so different after all...“ *Molecular BioSystems*, 4, 2008: 721-725.
- Nishikawa, J., T. Kudo, S. Sakata, Y. Benno, und T. Sugiyama. „Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis.“ *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44, 2009: 180-186.
- Nishiura, H., Y. Shibuya, S. Matsubara, S. Tanase, T. Kambara, und T. Yamamoto. „Monocyte Chemotactic Factor in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue.“ *Journal of Biological Chemistry*, 271, 1996: 878-882.
- Niyonsaba, F., A. Someya, M. Hirata, H. Ogawa, und I. Nagaoka. „Evaluation of the effects of peptide antibiotics human I -defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D2 production from mast cells.“ *European Journal of Immunology*, 31 (4), 2001: 1066-1075.
- Niyonsaba, F., et al. „A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis.“ *Immunology*, 106, 2002: 20-26.
- Noga, E. J., P. J. Borron, J. Hinshaw, W. C. Gordon, L. J. Gordon, und J.-K. Seo. „Identification of histones as endogenous antibodics in fish and quantification in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin and gill.“ *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 2011: 135-152.
- Nuding, S., K. Fellermann, J. Wehkamp, H. A. G. Mueller, und E. F. Stange. „A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts.“ *Journal of Microbiological Methods*, 65, 2006: 335-345.

- Nuding, S., K. Fellermann, J. Wehkamp, und E. F. Stange. „Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon.“ *Gut*, 56, 2007: 1240-1247.
- Ohland, C. L., und W. K. MacNaughton. „Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function.“ *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298, 2010: G807-G819.
- O'Neil, D. A., et al. „Expression and Regulation of the Human α -Defensins hBD-1 and hBD-2 in Intestinal Epithelium.“ *The Journal of Immunology*, 163 (12), 1999: 6718-6724.
- Oppenheim, J. J., A. Biragyn, L. W. Kwak, und D. Yang. „Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity.“ *Annals of Rheumatic Diseases*, 62 (Supplement 2), 2003: ii17-ii21.
- O'Sullivan, M., und C. O'Morain. „Nutrition in Inflammatory Bowel Disease.“ *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 20, 2006: 561-573.
- Ott, S. J., et al. „Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease.“ *Gut*, 53 (5), 2004: 685-693.
- Otte, J.-M., K. Kiehne, und K.-H. Herzig. „Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine.“ *Journal of Gastroenterology*, 38, 2003: 717-726.
- Ouellette, A. J. „Defensin-mediated innate immunity in the small intestine.“ *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 18, 2004: 405-419.
- Palic, D., J. Ostojic, C. B. Andreasen, und J. A. Roth. „Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils.“ *Developmental and Comparative Immunology*, 31, 2007: 805-816.
- Park, C. B., H. S. Kim, und S. C. Kim. „Mechanisms of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244, 1998: 253-257.
- Park, C. B., K. S. Yi, K. Matsuzaki, M. S. Kim, und S. C. Kim. „Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the

- proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II .“ *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97, 2000: 8245-8250.
- Park, C. B., M. S. Kim, und S. C. Kim. „A Novel Antimicrobial Peptide from *Bufo bufo gargarizans*.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218, 1996: 408-413.
- Park, S. J., W. H. Kim, und J. H. Cheon. „Clinical characteristics and treatment of inflammatory bowel disease: A comparison of Eastern and Western perspectives.“ *World Journal of Gastroenterology*, 7 (20), 2014: 11525-11537.
- Parseghian, M. L., und K. A. Luhrs. „Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity.“ *Biochemical Cell Biology*, 84, 2006: 589-604.
- Pärssinen, J., E.-L. Alarmo, S. Khan, R. Karhu, M. Vihinen, und A. Kallioniemi. „Identification of differentially expressed genes after PPM1D silencing in breast cancer.“ *Cancer Letters*, 259, 2008: 61-70.
- Patat, S. A., R. B. Carnegie, P. S. Gross, R. Chapman, und K. L. Schey. „Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp.“ *European Journal of Biochemistry*, 271, 2004: 4825-4833.
- Pazgier, M., D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, und J. Lubkowski. „Human b-defensins.“ *Cellular and Molecular Life Science*, 63 (11), 2006: 1294-1313.
- Persson, P. G., A. Ahlbom, und G. Hellers. „Inflammatory bowel disease and tobacco smoke - a case-control study.“ *Gut*, 31 (12), 1990: 1377-1381.
- Persson, P.-G., C.-E. Leijonmarck, O. Bernell, G. Hellers, und A. Ahlbom. „Risk Indicators for Inflammatory Bowel Disease.“ *International Journal of Epidemiology*, 22 (2), 1993: 268-272.
- Pettitt, J., C. Crombie, D. Schümperli, und B. Müller. „The *Caenorhabditis elegans* histone hairpin-binding protein is required for core histone gene expression and is essential for embryonic and postembryonic cell division.“ *Journal of Cell Science*, 115 (4), 2002: 857-866.
- Peyrin-Biroulet, L., et al. „Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (19), 2010: 8772-8777.

- Potten, C. S., M. Kellett, S. A. Roberts, D. A. Rew, and G. D. Wilson. „Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine.“ *Gut*, 33, 1992: 71-78.
- Pullan, R. D., et al. „Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis.“ *Gut*, 35, 1994: 353-359.
- Pütsep, K., C.-I. Brändén, H. G. Boman, und S. Normark. „Antibacterial peptide from *H. pylori*.“ *Nature*, 398, 1999: 671-672.
- Qu, X.-D., und R. I. Lehrer. „Secretory Phospholipase A2 is the Principal Bactericide for Staphylococci and other Gram-Positive Bacteria in Human Tears.“ *Infection and Immunity*, 66 (6), 1998: 2791-2797.
- Quayle, A. J., et al. „Gene Expression, Immunolocalization, and Secretion of Human Defensin-5 in Human Female Reproductive Tract.“ *American Journal of Pathology*, 152 (5), 1998: 1247-1258.
- Raj, P. A., und A. R. Dentino. „Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity.“ *FEMS Microbiology Letters*, 206 (1), 2002: 9-18.
- Rattray, A. M. J., und B. Müller. „The control of histone gene expression.“ *Biochemical Society Transactions*, 40, 2012: 880-885.
- Roda, G., et al. „Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases.“ *World Journal of Gastroenterology*, 16 (34), 2010: 4264-4271.
- Rodríguez-Jimenez, F.-J., et al. „Distribution of new human b-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis.“ *Genomics*, 81, 2003: 175-183.
- Rose, F. R. A. J., K. Bailey, J. W. Keyte, W. C. Chan, D. Greenwood, und Y. R. Mahida. „Potential Role of Epithelial Cell-Derived Histone H1 Proteins in Innate Antimicrobial Defense in the Human Gastrointestinal Tract.“ *Infection and Immunity*, 66 (7), 1998: 3255-3263.
- Rosenthal, M. D., M. N. Gordon, E. S. Buescher, J. H. Slusser, L. K. Harris, und R. C. Franson. „Human Neutrophils Store Type II 14-kDa Phospholipase A2 in Granules and Secrete Active Enzyme in Response to Soluble Stimuli.“ *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 208 (2), 1995: 650-656.

- Rubin, G. P., A. P. S. Hungin, P. J. Kelly, und J. Ling. „Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population.“ *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14 (12), 2000: 1553-1559.
- Saffarzadeh, M., et al. „Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones.“ *PLoS ONE*, 7 (2), 2012: e32366.
- Saiki, R.I. K., et al. „Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase.“ *Science*, 239, 1988: 487-491.
- Saitoh, T., et al. „Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1.“ *Cell Host and Microbe*, 12, 2012: 109-116.
- Salim, S. Y., und J. D. Söderholm. „Importance of Disrupted Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Diseases.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 17 (1), 2011: 362-381.
- Sansonetti, P. J. „War and Peace at mucosal surfaces.“ *Nature Reviews Immunology*, 4, 2004: 953-964.
- Sanz, Y., und G. De Palma. „Gut Microbiota and Probiotics in Modulation of Epithelium and Gut-Associated Lymphoid Tissue Function.“ *International Reviews of Immunology*, 28 (6), 2009: 397-413.
- Sarma, K., und D. Reinberg. „Histone Variants meet their Match.“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 2005: 139-149.
- Sartor, R. B. „Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases.“ *Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology*, 134, 2008: 577-594.
- Sartor, R. B., H. C. Rath, und R. K. Sellon. „Microbial factors in chronic intestinal inflammation.“ *Current Opinion in Gastroenterology*, 12, 1996: 327-333.
- Sautière, P., D. Kmieć, O. Loy, G. Briand, und G. Biserte. „Chicken Erythrocyte Histone H5 ; II Amino Acid Sequence Adjacent to the Phenylalanine Residue.“ *FEBS Letters*, 50, 1975: 200-203.
- Schauber, J., et al. „Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases.“ *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18 (6), 2006: 615-621.

- Schmid, M., K. Fellermann, P. Fritz, O. Wiedow, E. F. Stange, und J. Wehkamp. „Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 81, 2007: 907-915.
- Schroeder, A., et al. „The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.“ *BMC Molecular Biology*, 7 (3), 2006: 1-14.
- Schroeder, B. O., et al. „Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human b-defensin 1.“ *Nature*, 469 (7330), 2011: 419-423.
- Schulzke, J. D., et al. „Epithelial Tight Junctions in Intestinal Inflammation.“ *Molecular Structure and Function of the Tight Junction: Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1165, 2009: 294-300.
- Schutte, B. C., et al. „Discovery of five conserved b-defensin gene clusters using a computational search strategy.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99 (4), 2002: 2129-2133.
- Scott, M. G., A. C. E. Vreugdenhil, W. A. Buurman, R. E. W. Hancock, und M. R. Gold. „Cutting Edge: Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein.“ *The Journal of Immunology*, 164 (2), 2000: 549-553.
- Scott, M. G., D. J. Davidson, M. R. Gold, D. Bowdish, und R. E. W. Hancock. „The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses.“ *The Journal of Immunology*, 169 (7), 2002: 3883-3891.
- Sedelnikova, O. A., und W. M. Bonner. „dH2Ax in Cancer Cells.“ *Cell Cycle*, 5 (24), 2006: 2909-2913.
- Sellon, R. K., et al. „Resident Enteric Bacteria Are Necessary for Development of Spontaneous Colitis and Immune System Activation in Interleukin-10-Deficient Mice.“ *Infection and Immunity*, 66 (11), 1998: 5224-5231.
- Shaw, S. Y., J. F. Blanchard, und C. N. Bernstein. „Association Between the Use of Antibiotics in the First Year of Life and Pediatric Inflammatory Bowel Disease.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 105, 2010: 2687-2692.
- Shechter, D., H. L. Dormann, C. D. Allis, und S. B. Hake. „Extraction, purification and analysis of histones.“ *Nature protocols*, 2 (6), 2007: 1445-1457.

- Shivananda, S., et al. „Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD).“ *Gut*, 39, 1996: 690-697.
- Silva, O. N., et al. „Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications.“ *Frontiers in Microbiology*, 2 (232), 2011: 1-14.
- Smith, M. M. „Histone structure and function.“ *Current Opinion in Cell Biology*, 3, 1991: 429-437.
- Sochacki, K. A., K. J. Barns, R. Bucki, und J. C. Weisshaar. „Real-time attack on single Escherichia coli cells by the human antimicrobial peptide LL-37.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 2011: E77-E81.
- Sol, A., Y. Skvirsky, E. Botnick, G. Bachrach, und A. Muhlrad. „Actin and DNA Protect Histones from Degradation by Bacterial Proteases but Inhibit Their Antimicrobial Activity.“ *Frontiers in Microbiology*, 7, 2016: Article 1248.
- Somerville, K. W., R. F. A. Logan, M. Edmond, und M. J. S. Langman. „Smoking and Crohn's disease.“ *British Medical Journal*, 289, 1984: 954-956.
- Sorensen, O. E., et al. „Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3.“ *Blood*, 97, 2001: 3951-3959.
- Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. „Histone.“ <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/histone/32070>, 1999.
- Speranzini, V., S. Pilotto, T. K. Sixma, und A. Mattevi. „Touch, act and go: landing and operating on nucleosomes.“ *The EMBO Journal*, 35, 2016: 376-388.
- Stange, E. F. „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - die letzten 50 Jahre.“ *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 51, 2013: 371-377.
- Subbalakshmi, C., und N. Sitaram. „Mechanism of antimicrobial action of indolicidin.“ *FEMS Microbiology Letters*, 160 (1), 1998: 91-96.
- Sullivan, E., et al. „Drosophila stem loop binding protein coordinates accumulation of mature histone mRNA with cell cycle progression.“ *Genes & Development*, 15 (2), 2001: 173-187.

- Swidsinski, A., V. Loening-Baucke, und A. Herber. „Mucosal Flora in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis - An Overview.“ *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60 (Suppl. 6), 2009: 61-71.
- Tang, D., R. Kang, C. B. Coyne, H. J. Zeh, und M. T. Lotze. „PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity.“ *Immunological Reviews*, 249 (1), 2012: 158-175.
- Tang, Y.-Q., et al. „A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated α -Defensins.“ *Science*, 286 (5439), 1999: 498-502.
- Taurog, J. D., et al. „The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats.“ *Journal of Experimental Medicine*, 180 (6), 1994: 2359-2364.
- Taylor, K., P. E. Barran, und J. R. Dorin. „Structure - Activity Relationships in α -Defensin Peptides.“ *Biopolymers*, 90, 2008: 1-7.
- Thia, K. T., E. V. Loftus, W. J. Sandborn, und S.-K. Yang. „An Update on the Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in Asia.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 103, 2008: 3167-3182.
- Tollin, M., P. Bergman, T. Svenberg, H. Jörnvall, G. H. Gudmundsson, und B. Agerberth. „Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa.“ *Peptides*, 24, 2003: 523-530.
- Tomasinsig, L., und M. Zanetti. „The Cathelicidins - Structure, Function and Evolution.“ *Current Protein and Peptide Sciences*, 6, 2005: 23-34.
- Tomonaga, T., et al. „Overexpression and Mistargeting of centromere Protein-A in Human Primary Colorectal Cancer.“ *Cancer Research*, 63 (13), 2003: 3511-3516.
- Tran, D., P. A. Trans, Y.-Q. Tang, J. Yuan, T. Cole, und M. E. Selsted. „Homodimeric α -Defensins from Rhesus macaque Leukocytes.“ *Journal of Biological Chemistry*, 277 (5), 2002: 3079-3084.
- Tremelling, M., et al. „IL23R Variation Determines Susceptibility But Not Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease.“ *Gastroenterology*, 132 (15), 2007: 1657-1664.

- Tysk, C., E. Lindberg, G. Järnerot, und B. Flodérus-Myrhed. „Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking.“ *Gut*, 29, 1988: 990-996.
- Uhlig, H. H., et al. „The Diagnostic Approach to Monogenic very early Onset Inflammatory Bowel Disease.“ *Gastroenterology*, 147 (5), 2014: 990-1007.
- Urban, C. F., et al. „Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*.“ *PLoS Pathogens*, 5 (10), 2009: e1000639.
- Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann, und A. Zychlinsky. „Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms.“ *Cellular Microbiology*, 8 (4), 2006: 668-676.
- Uyterhoeven, E. T., C. H. Butler, D. Ko, und D. E. Elmore. „Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin II.“ *FEBS Letters*, 582, 2008: 1715-1718.
- Uzzell, T., E. D. Stolzenberg, A. E. Shinnar, und M. Zasloff. „Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins.“ *Peptides*, 24 (11), 2003: 1655-1667.
- Valore, E. V., C. H. Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, P. B. McCray, und T. Ganz. „Human b-Defensin-1: An Antimicrobial Peptide of Urogenital Tissues.“ *Journal of Clinical Investigation*, 101 (8), 1998: 1633-1642.
- Valore, E. V., E. Martin, S. S. L. Harwig, und T. Ganz. „Intramolecular Inhibition of Human Defensin HNP-1 by Its Propiece.“ *The Journal of Clinical Investigation*, 97, 1996: 1624-1629.
- Valore, E. V., und T. Ganz. „Posttranslational Processing of Defensins in Immature Human Myeloid Cells.“ *Blood*, 79 (6), 1992: 1538-1544.
- Van der Have, M., et al. „Determinants of health-related quality of life in Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis.“ *Journal of Crohn's and Colitis*, 8, 2014: 93-109.
- Van Limbergen, J., et al. „Definition of Phenotypic Characteristics of Childhood-Onset Inflammatory Bowel Disease.“ *Gastroenterology*, 135, 2008: 1114-1122.

- Van Weterin, S., P. J. Sterk, K. F. Rabe, und P. S. Hiemstra. „Defensins: Key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung?“ *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 (6), 1999: 1131-1138.
- Venugopal, A. A., und S. Johnson. „Current state of Clostridium difficile treatment options.“ *Clinical Infectious Diseases*, 55 (Suppl. 2), 2012: 71-76.
- Vind, I., et al. „Increasing Incidences of Inflammatory Bowel Disease and Decreasing Surgery Rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: A Population-Based Study from the Danish Crohn Colitis Database.“ *The American Journal of Gastroenterology*, 101, 2006: 1274-1282.
- Wang, X., S. P. Heazlewood, D. O. Krause, und T. H. J. Florin. „Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis.“ *Journal of Applied Microbiology*, 95 (3), 2003: 508-520.
- Wang, Z., und G. Wang. „APD: the Antimicrobial Peptide Database.“ *Nucleic Acids Research*, 32 (Database issue), 2004: D590-D592.
- Waring, M. J. „Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids.“ *Journal of Molecular Biology*, 13, 1965: 269-282.
- Wehkamp, J., E. F. Stange, und K. Fellermann. „Defensin-immunology in Inflammatory Bowel Disease.“ *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 33, Suppl. 3, 2009: S137-S144.
- Wehkamp, J., et al. „Human b-defensin 2 but not b-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease.“ *European Journal of Gastroenterology*, 14 (7), 2002: 745-752.
- Wehkamp, J., et al. „NF- κ B and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by Escherichia coli Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium.“ *Infection and Immunity*, 72 (10), 2004: 5750-5758.
- Wehkamp, J., et al. „Inducible and Constitutive b-Defensins are Differentially Expressed in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis.“ *Inflammatory Bowel Disease*, 9 (4), 2003: 215-223.
- Wehkamp, J., et al. „Reduced Paneth cell a-defensins in ileal Crohn's disease.“ *Proceedings of the National Academy of Science*, 102 (50), 2005: 18129-18134.

- Wehkamp, J., et al. „The Paneth Cell α -Defensin Deficiency of Ileal Crohn's Disease Is Linked to Wnt/Tcf-4.“ *The Journal of Immunology*, 179 (5), 2007: 3109-3118.
- Wehkamp, J., M. Koslowski, G. Wang, und E. F. Stange. „Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease.“ *Mucosal Immunology*, 1 (Suppl. 1), 2008: 67-74.
- Wehkamp, J., M. Schmid, K. Fellermann, und E. F. Stange. „Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 77 (4), 2005b: 460-465.
- Wehkamp, J., und E. F. Stange. „Paneth's Disease.“ *Journal of Crohn's and Colitis*, 4, 2010: 523-531.
- White, S. H., W. C. Wimley, and M. E. Selsted. "Structure, function, and membrane integration of defensins." *Current Opinion in Structural Biology*, 5, 1995: 521-527.
- Wiesner, J., und A. Vilcinskas. „Antimicrobial peptides - The ancient arm of the human immune system.“ *Virulence*, 1 (5), 2010: 440-464.
- Xu, J., et al. „Extracellular histones are major mediators of death in sepsis.“ *Nature Medicine*, 15 (11), 2009: 1318-1322.
- Yamaguchi, Y., et al. „Identification of Multiple Novel Epididymis-Specific β -Defensin Isoforms in Humans and Mice.“ *Journal of Immunology*, 169 (5), 2002: 2516-2523.
- Yang, D., A. Biragyn, L. W. Kwak, und J. J. Oppenheim. „Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal.“ *Trends in Immunology*, 23 (6), 2002: 291-296.
- Yang, D., 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.“ *Journal of Experimental Medicine*, 192 (7), 2000b: 1069-1074.
- Yang, D., O. Chertov, und J. J. Oppenheim. „Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37).“ *Journal of Leukocyte Biology*, 69 (5), 2001: 691-697.

- Yang, D., Q. Chen, O. Chertov, und J. J. Oppenheim. „Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 68 (1), 2000a: 9-14.
- Yapp, T. R., R. Stenson, G. A. O. Thomas, B. W. Lawrie, G. T. Williams, und A. B. Hawthorne. „Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995.“ *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 12 (8), 2000: 907-911.
- Yeaman, M. R., und N. Y. Yount. „Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance.“ *Pharmacological Reviews*, 55 (1), 2003: 27-55.
- Yu, T., J. P. MacPhail, J. P. Banáth, D. Klovov, und P. L. Olive. „Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability.“ *DNA Repair*, 5 (8), 2006: 935-946.
- Zaiou, M., V. Nizet, und R. L. Gallo. „Antimicrobial and Protease Inhibitory Functions of the Human Cathelicidin (hCAP18/LL-37) Prosequence.“ *Journal of Investigative Dermatology*, 120, 2003: 810-816.
- Zanetti, M., R. Gennaro, und R. Romeo. „Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain.“ *FEBS Letters*, 374, 1995: 1-5.
- Zhang, H., J. Villar, und A. R. Slutsky. „Circulating Histones: A Novel Target in Acute Respiratory.“ *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187 (2), 2013: 118-120.
- Zhang, K., und H. Tang. „Analysis of core histones by liquid chromatography-mass spectrometry and peptide mapping.“ *Journal of Chromatography B*, 783, 2003: 173-179.
- Zhu, S. „Did cathelicidins, a family of multifunctional host-defense peptides, arise from a cysteine protease inhibitor?“ *Trends in Microbiology*, 16, 2008: 353-360.
- Zhu, Z., A. R. Boobis, und R. J. Edwards. „Identification of estrogen-responsive proteins in MCF-7 human breast cancer cells using label-free quantitative proteomics.“ *Proteomics*, 8, 2008: 1987-2005.

Zhu, Z., R. J. Edwards, and A. R. Boobis. „Increased Expression of Histone Proteins during Estrogen-Mediated Cell Proliferation.“ *Environmental Health Perspectives*, 117 (6), 2009: 928-934.

Zuh, P., und G. Li. „Structural insights of nucleosome and the 30-nm chromatin fiber.“ *Current Opinion in Structural Biology*, 36, 2016: 106-115.

6 Publikationsliste

Vorträge:

Kunkel, Y., Nuding S. und Stange E.F. Antibakterielle Funktion von Histonen in der intestinalen Mukosa. **DGVS-Tagung, Leipzig (09/2015)**

Posterpräsentationen:

Kunkel, Y., Nuding S. und Stange E.F. Histones as components of the antimicrobial barrier of the human colonic mucosa. **NCII-Tagung, Tübingen (09/2015)**

Preise:

Abstractpreis von der „Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion für Gastroenterologische Endoskopie“, **DGVS-Tagung, Leipzig (09/2015)**.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Eduard F. Stange für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Vielen Dank, dass ich an diesem interessanten Thema arbeiten durfte und für Ihre kontinuierliche Unterstützung.

Herrn Prof. Lutz Graeve danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, seine Unterstützung in organisatorischen Fragen und besonders für seine Zeit.

Prof. Dr. Florian Fricke danke ich für seine Bereitschaft als weiterer Prüfer zu fungieren.

Professor Matthias Schwab, dem Leiter des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie, danke ich, dass ich diese Arbeit am IKP durchführen durfte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Sabine Nuding für ihre kompetente Betreuung und die vielen wertvollen Hinweise bedanken. Danke, dass du stets ein offenes Ohr für meine Fragen hattest.

Den restlichen Mitgliedern der AG Stange, Dagmar Weller, Simone Harsch und Silke Schimmel, danke ich für die wunderbaren Stunden im Büro und Labor, die wertvollen Anregungen und ihre Hilfe.

Außerdem danke ich Marina Meiers für ihre Korrekturen und wertvolle Hinweise.

Christoph danke ich für seine Unterstützung auf dem Weg hierher. Seine Kraft und sein Zuspruch haben mich immer wieder aufgebaut. Vielen Dank, mein Schatz, auch für die vielen Stunden des Korrekturlesens.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern. Danke, dass ihr mich auf meinem Weg immer unterstützt habt. Die Arbeit ist meiner Mutter Marion und meinem Vater Klaus gewidmet.