

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Claus Vogelmeier  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Der Einfluss von Vitamin D auf das angeborene Immunsystem**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Meret Branscheidt**

aus Oberursel

Marburg 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 22.07.2013

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dr. R. Bals

Korreferent: Prof. Dr. S. Bauer

## Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem dient der schnellen und wirksamen Abwehr von Pathogenen. Eine fein abgestimmte Regulation seiner Funktion ist entscheidend für die Integrität des Organismus. Verschiedene endogene Faktoren (z. B. Hormone oder Zytokine) sowie exogene Faktoren (z. B. Zigarettenrauch oder Umweltpathogene) können das komplexe Gleichgewicht beeinflussen.

Zu den klassischen Funktionen von Vitamin D gehört die Regulierung des Kalzium- und Phosphatmetabolismus. Erst in den letzten Jahren wurde die Bedeutung von Vitamin D für die Physiologie des angeborenen und adaptiven Immunsystems erkannt. Die genauen molekularen Abläufe, über die Vitamin D seine Wirkung als Immunmodulator entfaltet, sind bisher nur teilweise verstanden.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses von Vitamin D auf verschiedene Funktionen des angeborenen Immunsystems nach Kontakt mit bakteriellen Pathogenen. In einem weiteren Schritt sollten die Auswirkungen von Zigarettenrauch auf die beobachteten Vitamin-D-Effekte analysiert werden.

Humane Makrophagen und neutrophile Granulozyten wurden mit Vitamin D in verschiedenen Konzentrationen sowie mit unterschiedlichen Toll-like-Rezeptor-Liganden inkubiert. Untersucht wurde die Expression des einzigen bisher bekannten humanen Cathelizidins hCAP-18/LL-37, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und die bakterielle Eliminationsrate unter Verwendung von quantitativer real time-PCR (qRT-PCR), Western-Blot, ELISA und eines bakteriellen Eliminationsassays.

Weiter wurden häufig verwendete Modellsysteme, wie die Zelllinien MonoMac 6 und U937 sowie murine Makrophagen, unter den für primäre humane Zellen verwendeten Konditionen stimuliert und die erhobenen Befunde verglichen.

Um eine mögliche Interaktion zwischen Zigarettenrauch und Vitamin D zu untersuchen, wurden primäre humane Makrophagen mit beiden Substanzen inkubiert und die Expression von hCAP-18/LL-37 Zytokinen analysiert .

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen eine antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkung von Vitamin D auf humane Makrophagen und neutrophile Granulozyten. In humanen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten kommt es zu einer gesteigerten Synthese von LL-37, während die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermindert ist. Diese Effekte gehen

mit einer Verbesserung der Eliminationsrate von lebenden Bakterien einher. Signifikante Effekte lassen sich dabei für Konzentrationen detektieren, die über den aktuellen Empfehlungen des *Institute of Medicine* für eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung liegen.

Bei der Analyse der Modellsysteme zeigte sich, dass Vitamin D die Synthese des murinen LL-37-Homologs *mouse cathelicidin related antimicrobial peptide* (mCRAMP) nicht verändert. In den untersuchten humanen Zelllinien kam es nach Vitamin D Gabe zu einer gesteigerten LL-37-Expression, jedoch blieb die Zytokinantwort unbeeinflusst.

Zigarettenrauch interferierte mit der Funktion von Vitamin D als Immunmodulator, indem er die Vitamin-D-vermittelte antimikrobielle Wirkung hemmte. Ein Einfluss auf die antiinflammatorischen Effekte ließ sich nicht nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung von Vitamin D für die Physiologie des Immunsystems. Seine Wirkung auf die Synthese endogener Antibiotika und die Entzündungsreaktion bieten interessante Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapiestrategien. Die Erhebungen der Dosis-Wirkungs-Beziehung in Zusammenschau mit aktuellen epidemiologischen Daten sowie die Interaktion zwischen Zigarettenrauch und Vitamin D könnten eine wichtige Rolle für die präventive Gesundheitsmassnahmen spielen.

---

## Summary

The innate immune system plays a crucial role in defending the organism from invading pathogens in a non-specific manner. The well-orchestrated regulation of its function is vital for the integrity of the organism. Different endogenous factors (e.g. hormones or cytokines) as well as exogenous factors (e.g. cigarette smoke or environmental toxins) can influence this complex equilibrium.

The regulation of calcium and phosphate metabolism has been considered as one of the classical functions of vitamin D. It is only in recent years that its meaning for the physiology of the innate and adaptive immune system was recognized. The exact molecular mechanisms, how vitamin D exerts its effect as an immune modulator, are only partly understood.

The aim of this work was to characterize the influence of vitamin D on human macrophages and neutrophil granulocytes after contact with bacterial pathogens. Possible interactions between the observed vitamin-D-effect and cigarette smoke were analyzed.

Human macrophages and neutrophil granulocytes were incubated with different concentrations vitamin D and TLR ligands. The bacterial elimination rate, the production of the only known human antimicrobial peptide hCAP-18/LL-37 (LL-37) and the changes in cytokine response were examined using a bacterial killing assay, ELISA qRT-PCR and western blot.

The cell lines U937 as well as MonoMac6 and murine peritoneal macrophages were stimulated under the same conditions used for primary human cells and the obtained results were compared.

In order to examine the interaction between cigarette smoke and vitamin D, primary human macrophages were incubated with both substances and the effects on the synthesis of LL-37 as well as the expression of proinflammatory cytokines were determined.

It could be shown that vitamin D has an antimicrobial and antiinflammatory impact on the innate immune functions. In macrophages and neutrophil granulocytes the induction of LL-37 is increased while the release of proinflammatory cytokines is decreased. This is accompanied with an enhancement of the bacterial elimination rate. Significant effects are detected for concentrations above the current recommendations for sufficient vitamin-D-levels from the *Institutes of Medicine*.

The comparison between different model systems showed that vitamin D does not increase the synthesis of the murine LL-37-homolog mCRAMP. In human cell lines the expression of LL-37 is increased but there is no influence on the cytokine response.

Cigarette smoke interferes with the efficacy of vitamin D as an immune modulator. It inhibits the vitamin-D-mediated antimicrobial effect without any influence on the antiinflammatory cytokine depression.

The results of this work underline the importance of vitamin D for the physiology of the immune system. Its impact on the synthesis of endogenous antibiotics and the inflammation reaction offers an interesting starting point for the development of new therapy strategies.

The analysis of dose-effect relationship in synopsis with current epidemiological data as well as the shown interaction between cigarette smoke and vitamin D could play a crucial role for primary preventive health care.

# Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.1 Toll-like Rezeptoren.....	1
1.1.2 Zellulärer Anteil des angeborenen Immunsystems.....	2
1.1.3 Zytokine.....	3
1.1.4 Antimikrobielle Peptide (AMPs).....	5
1.2 Vitamin D.....	10
1.2.1 Synthese und Metabolismus.....	10
1.2.2 Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR).....	12
1.2.3 Vitamin D und das angeborene Immunsystem.....	15
1.2.4 Extrarenaler Metabolismus von Vitamin D.....	15
1.2.5 Referenzwerte für den Vitamin-D-Status.....	17
1.2.6 Vitamin-D-assoziierte Erkrankungen.....	18
1.2.7 Zigarettenrauch als Einflussfaktor auf die Immunfunktion.....	18
<b>2 Fragestellung</b> .....	20
<b>3 Material und Methoden</b> .....	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Lösungen und Puffer.....	21
3.1.2 Chemikalien.....	24
3.1.3 Zellmedien.....	26
3.1.4 Reaktionssysteme und Geräte.....	27
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 Methoden der Zellkultur.....	29
3.2.2 Stimulationsexperimente.....	32
3.2.3 RNA-Präparation.....	34
3.2.4 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
3.2.5 cDNA-Synthese.....	35
3.2.6 Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR) und Gelelektrophorese.....	36
3.2.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	40
3.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot.....	42
3.2.9 Eliminationsassay.....	45
3.2.10 Herstellung von Zigarettenrauch-Extrakt ( <i>cigarette smoke extract</i> , CSE).....	47
3.2.11 Stimulation mit Zigarettenrauch-Extrakt.....	48
3.2.12 Statistische Analysen.....	48
<b>4 Ergebnisse</b> .....	49
4.1 Stimulationsexperimente mit Vitamin D.....	49

---

4.1.1	Stimulation von humanen Makrophagen.....	49
4.1.2	Stimulation neutrophiler Granulozyten .....	55
4.1.3	Die Modell-Zelllinien U937 und MonoMac6.....	58
4.2	Eliminationsassay.....	60
4.2.1	Vitamin D steigert die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen.....	60
4.2.2	Bei LL-37-resistenten Bakterienstämmen zeigt Vitamin D keine Steigerung der antimikrobiellen Aktivität .....	60
4.3	Stimulation mit Zigarettenrauch-Extrakt.....	63
4.3.1	Unter CSE-Stimulation kommt es nicht zur Induktion von hCAP-18- mRNA durch Vitamin D.....	63
4.3.2	Zigarettenrauch-Extrakt beeinflusst die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung .....	63
4.3.3	Vitamin D beeinflusst die CSE induzierte Zytokinausschüttung.....	64
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>65</b>
5.1	Die Wirkung von Vitamin D auf die Produktion antimikrobieller Peptide.....	65
5.2	Steigerung der Eliminationsrate lebender Bakterien durch Vitamin D .....	67
5.3	Beeinflussung der Entzündungsreaktion durch Vitamin D.....	68
5.4	Die Wirkung von Vitamin D auf Mausmakrophagen und Zelllinien .....	69
5.4.1	Die Beeinflussung von CRAMP und hCAP-18 in Modellsystemen durch Vitamin D .....	69
5.4.2	Die Beeinflussung der Zytokinexpression durch Vitamin D in verschiedenen Modellsystemen.....	70
5.5	Interaktion zwischen Zigarettenrauch und Vitamin D .....	72
<b>6</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>765</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>101</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>101</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Menschen jeden Tag vor einer Vielzahl schädlicher Mikroorganismen. Es wird in zwei funktionelle Einheiten unterteilt:

- 1) das angeborene oder unspezifische Immunsystem und
- 2) das nur bei Vertebraten vorkommende erworbene oder adaptive Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem dient dem Organismus zur unmittelbaren und schnell reagierenden Abwehr von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten. Die Fähigkeit des Immunsystems zwischen „fremd“ und „eigen“ zu unterscheiden, ist essentieller Bestandteil der erfolgreichen Bekämpfung von Infektionen (Janeway 1992).

Pathogene können vom angeborenen Immunsystem anhand charakteristischer Strukturmerkmale erkannt werden. Anders als beim adaptiven Immunsystem ist für die Erkennung durch das angeborene Immunsystem kein vorheriger Kontakt mit dem Pathogen notwendig. Die Strukturmerkmale werden als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) bezeichnet und sind innerhalb der verschiedenen Gruppen der Pathogene hochkonserviert (Medzhitov 2007).

Die Rezeptoren, die in der Lage sind PAMPs zu erkennen, werden zu der Familie der mustererkennenden Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) zusammengefasst, zu denen u. a. die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören (Medzhitov 2007; Kumar, Kawai, and Akira 2011).

### 1.1.1 Toll-like Rezeptoren

Bei den TLRs handelt es sich um eine der ältesten konservierten Komponenten des Immunsystems (Aderem and Ulevitch 2000). 13 Mitglieder der TLR-Familie konnten bisher in Säugetieren charakterisiert werden, davon sind jedoch nur zehn beim Menschen funktionell aktiv (Medzhitov 2007; Kumar, Kawai, and Akira 2011).

TLRs sind Transmembranrezeptoren, deren extrazelluläre Anteile durch Leucin-reiche Wiederholungen (*leucin-rich repeats*, LRRs) gekennzeichnet sind. Der

zytoplasmatische Anteil der Proteine weist eine Verwandtschaft mit der Interleukin-1-(IL-1)-Rezeptor-Familie auf und wird deshalb als TIR-Domäne (Toll-/IL-1-Rezeptor-Domäne) bezeichnet. Beide Rezeptoren bilden zusammen die IL-1-Rezeptor/TLR-Superfamilie (O'Neill 2008; Farhat et al. 2008). Den verschiedenen TLRs können allgemein bei Pathogenen vorkommende, klassische Aktivatoren (Liganden) zugeordnet werden: TLR4 kann über Lipopolysaccharide (LPS), TLR9 über bakterielle Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*; DNA), TLR3 über virale doppelsträngige Ribonukleinsäure (*double-stranded ribonucleic acid*, dsRNA), TLR7 und 8 über virale einzelsträngige Ribonukleinsäure (*single-stranded ribonucleic acid*, ssRNA) und TLR5 über Flagellin aktiviert werden (Takeda and Akira 2005). Eine Sonderstellung nehmen TLR1, TLR2 und TLR6 ein: Während andere TLRs Homodimere bilden, ist TLR2 in der Lage mit TLR1 und TLR6 Heterodimere zu formen, wodurch eine differenzierte Erkennung von Lipoproteinen grampositiver und -negativer Bakterien möglich wird (Ozinsky et al. 2000; Farhat et al. 2008).

Die Bindung mikrobieller Faktoren an einen TLR löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die letztlich Mechanismen in Gang setzt, die der Abwehr des Pathogens dienen. Über Adaptermoleküle (wie MyD88 (engl. *myeloid differentiation primary response gene*), IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ), MAL/TIRAP, TRAM (*TRIF-related adapter molecule*), IPS-1), die an die TIR-Domäne der Rezeptoren binden, werden verschiedene Kinasen (IKK-complex, (MAPK) (*Mitogen-activated protein kinase*), TBK1, RIP-1) und Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), STATs (*signal transducer and activator of transcription*), IRFs) in der Zelle aktiviert (Zhu and Mohan 2010; Jeong and Lee 2011). Über die Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer veränderten Genexpression von Effektorproteinen (u. a. proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Interferone (IFN)).

### 1.1.2 Zellulärer Anteil des angeborenen Immunsystems

Der zelluläre Anteil des angeborenen Immunsystems umfasst Epithelzellen, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen sowie natürliche Killerzellen. Über TLRs auf ihrer Oberfläche können diese Zellen eingedrungene Pathogene auch bei Erstkontakt erkennen und sofort reagieren.

### 1.1.2.1 Makrophagen

Über myeloide Vorläuferzellen des Knochenmarks entwickeln sich im Blut zirkulierende Monozyten, die ins Gewebe auswandern und dort zu reifen Makrophagen differenzieren. Makrophagen sind in der Lage, Mikroorganismen über Phagozytose abzubauen. Gleichzeitig sezernieren aktivierte Makrophagen eine Reihe von Faktoren, darunter Zytokine, Chemokine, Enzyme und antimikrobielle Peptide. Als Antigen-präsentierende Zellen stellen sie darüber hinaus Kontakt zum adaptiven Immunsystem her (Platt, da Silva, and Gordon 1998). Makrophagen besitzen ein breites proinflammatorisches Potential und sind maßgeblich an der Gewebeschädigung bei chronisch-entzündlichen Krankheiten beteiligt (Laskin et al. 2011). Neben der Beeinflussung der adaptiven Immunantwort ist deshalb auch die Modulation der Makrophagen-Reaktion in den letzten Jahren als vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Behandlung chronisch-entzündlicher und autoimmun-vermittelter Erkrankungen erkannt worden (Burke et al. 2002; Bréchet et al. 2008; Suttles and Stout 2009; Mbow and Sarisky 2005).

### 1.1.2.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Immunzellen, die bei einer akuten Entzündung am Entzündungsort nachgewiesen werden können. Sie beeinflussen im Verlauf des Entzündungsgeschehens essentiell die Migration von Monozyten/Makrophagen durch die Ausschüttung von Chemokinen (Soehnlein, Weber, and Lindbom 2009; Doherty et al. 1988). Durch Phagozytose und durch die Sekretion reaktiver Sauerstoffmetabolite (*oxidative burst*) nehmen sie eine zentrale Rolle bei der Infektionsabwehr ein. Neutrophile Granulozyten sind Schlüsselzellen bei der Pathogenese einiger chronisch-entzündlicher Erkrankungen, so z. B. bei der Bildung von Emphysemen im Rahmen einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD), bei rheumatoider Arthritis und bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Stockley 2002; Foell et al. 2003; Goulding et al. 1998; Mohr 2003).

### 1.1.3 Zytokine

Zytokine dienen der Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems und orchestrieren die Immunantwort. Proinflammatorische Zytokine regulieren die Entzündungsreaktion, die auf einen schädlichen Stimulus folgt. Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und IL-6 sind die klassischen Mediatoren der

akuten Entzündung.  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  nehmen dabei eine Sonderstellung ein, da sie auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der chronischen Entzündung spielen. Für das murine Zytokin CXCL-1/KC konnte eine dem humanen Zytokin IL-8 in vielen Punkten äquivalente Wirkungsweise nachgewiesen werden (Frink et al. 2007).

Zytokine zeigen neben ihrer lokalen Wirkung in hohen Konzentrationen auch einen systemischen Effekt. Die Wirkung akut erhöhter Zytokinspiegel reicht dabei von einer einfachen Allgemeinsymptomatik mit Fieber und Nachtschweiß bis zum klinischen Bild des septischen Schocks. Eine chronische Erhöhung proinflammatorischer Zytokine wird mit Gewebeschädigung, Atherosklerose und Kachexie in Zusammenhang gebracht (Beutler and Cerami 1988; Elenkov et al. 2005).

#### 1.1.3.1 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

IL-1 $\beta$  gehört zu der Familie der Interleukine, einer Untergruppe innerhalb der Zytokine, die 35 Mitglieder umfasst (IL-1 bis IL-35). Die IL-1 $\beta$ -Vorläufer-Proteine werden intrazellulär in sekretorischen Granula gespeichert und durch Caspase-1 aktiviert (Sansonetti et al. 2000). Die Ausschüttung von IL-1 $\beta$  erfolgt durch phagozytierende Leukozyten, außerdem durch T- und B-Zellen sowie Fibroblasten und Keratinozyten. Über die Steigerung der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Produktion (PGE<sub>2</sub>) in Endothelzellen des Hypothalamus wirkt IL-1 $\beta$  als Pyrogen. Gleichzeitig gehört es zur Gruppe der Zytokine, die die Akute-Phase-Reaktion in der Leber initiieren (Dinarello 2011). In Mastzellen triggert IL-1 $\beta$  die Freisetzung von Histamin, welches wiederum zur Vasodilatation und einer gesteigerten vaskulären Permeabilität im entzündeten Gewebe führt (Dinarello 2011). Durch die Stimulation der T-Zellproliferation erfolgt der Brückenschlag zum adaptiven Immunsystem.

#### 1.1.3.2 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  wirkt häufig synergistisch mit IL-1 $\beta$  zusammen. Der humane TNF- $\alpha$  ist ein homotrimeres Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 17 kDA (Goeddel et al. 1986). Die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  erfolgt überwiegend durch aktivierte Makrophagen. Aber auch Fibroblasten, Mastzellen, natürliche Killerzellen und T-Zellen sind in der Lage den Faktor zu synthetisieren (Beutler and Cerami 1988). LPS und verschiedene andere bakterielle PAMPs sowie IL-1 $\beta$  triggern die Sekretion von TNF- $\alpha$ . Über die Bindung an spezifischen Rezeptoren (TNF-R1 und -R2) kommt es zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signalweges, die beide

wiederum zur Induktion verschiedener Zielgene führen (Goeddel et al. 1986). Zu den proinflammatorischen Effekten, die über TNF- $\alpha$  vermittelt werden, gehört u. a. die Induktion der Akuten-Phase-Reaktion sowie die Induktion von Fieber. Letzteres geschieht entweder direkt durch die gesteigerte PGE2-Synthese oder indirekt über eine gesteigerte Ausschüttung anderer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 usw.) (Feghali and Wright 1997).

#### **1.1.4 Antimikrobielle Peptide (AMPs)**

Die Produktion von AMPs gehört zu den ältesten Strategien der Wirtsabwehr und ist eine wichtige Komponente der angeborenen Immunität. AMPs können über alle biologischen Klassen hinweg in den meisten lebenden Organismen nachgewiesen werden. Dem Aufbau nach handelt es sich um kleine aliphatische Peptide (6–100 Aminosäuren), die ein breites Spektrum antimikrobieller Aktivität gegen grampositive und -negative Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten entfalten (Izadpanah and Gallo 2005). AMPs bilden eine sehr heterogene Gruppe von Effektormolekülen, die sich in Länge, Zusammensetzung und Struktur stark unterscheiden.

Das erste humane AMP (Laktoferrin) wurde 1922 von Paul Flemming entdeckt. Seitdem konnten verschiedene weitere Vertreter dieser Molekülklasse im Menschen identifiziert werden, darunter Cathelizidine und Defensine, die zu den wichtigsten Vertretern humaner AMPs gehören (Doss et al. 2010; Diamond, Beckloff, and Ryan 2008; Bals and Hiemstra 2006).

##### **1.1.4.1 Cathelizidine**

Cathelizidine bilden eine große Familie antimikrobiell und immunmodulatorisch aktiver Peptide. Die charakteristische Struktur der Peptide der Cathelizidin-Familie besteht aus:

- (1) einer N-terminalen Signalsequenz, die den Transport zum endoplasmatischen Retikulum (ER) reguliert;
- (2) einer hoch konservierten Proregion: der Cathelin-ähnlichen-Domäne;
- (3) einer stark heterogenen Cathelizidin-Domäne am C-terminalen Ende (Tomasinsig and Zanetti 2005; Bals 2000).

Die Cathelizidin-Domäne ist der biologisch-aktive Teil des AMPs (siehe Abbildung 1) und variiert in ihrer Länge zwischen 12–80 Aminosäuren (Zanetti, Gennaro, and

---

Romeo 1995). Die antimikrobielle Wirkung der Cathelizidine wird hauptsächlich über ihre kationische Ladung und ihre amphiphatische Polarität vermittelt, über die sie mit der anionisch geladenen bakteriellen Zellmembran interagieren und sich in diese einlagern können. Die partielle Selektivität gegenüber Prokaryonten ist durch die Lipidzusammensetzung ihrer Zellmembran begründet (fehlender Cholesterol-Einbau) (Zanetti, Gennaro, and Romeo 1995). Über welche Mechanismen Cathelizidine Mikroorganismen eliminieren, ist bislang nicht vollständig geklärt. Unterschiedliche Hypothesen wurden formuliert, darunter:

- 1) Depolarisation der bakteriellen Membran;
- 2) Bildung von Membranporen, die zu einem Verlust intrazellulärer Substanzen führen;
- 3) Induktion von Hydroxylasen, die zum Abbau der Zellwand führen und
- 4) Zerstörung essentieller intrazellulärer Peptide nach Internalisierung (Zasloff 2002; Westerhoff et al. 1989; Zanetti et al. 2000).

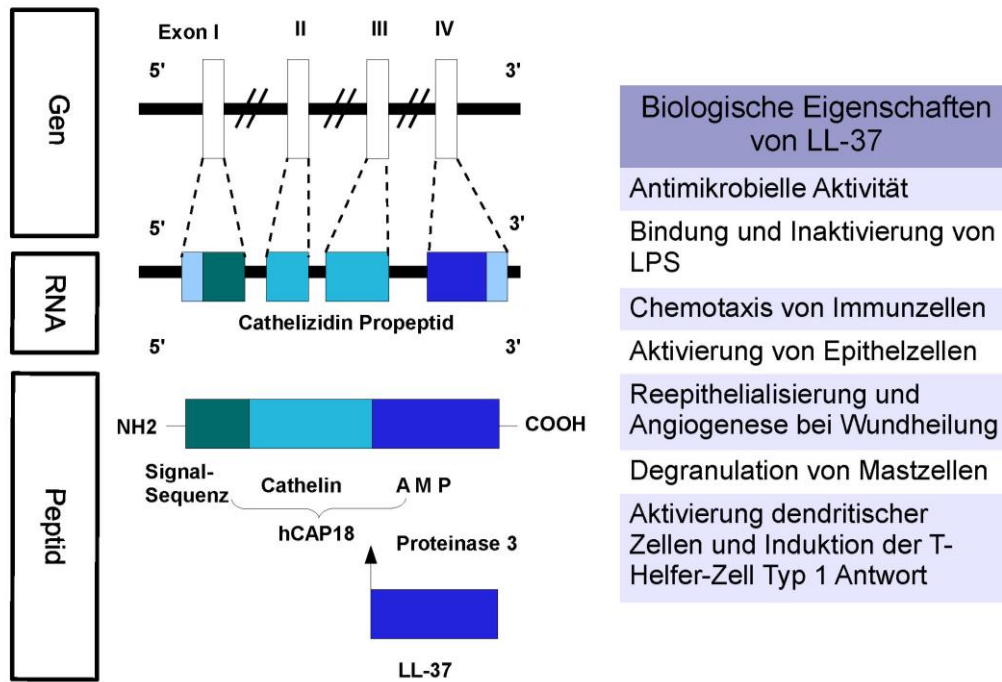


Abbildung 1: Prozessierung, Struktur und Wirkungen des humanen Cathelidins. Verändert nach: Bals, R.: Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* 1, 141-150 (2000).

#### 1.1.4.2 Humanes Cathelizin (hCAP-18/LL-37)

Für den Menschen konnte das CAMP-Gen, das sich auf Chromosom 3 befindet und aus vier Exons besteht, bislang als einziges Cathelizin-Gen detektiert werden (Gudmundsson et al. 1996; Bals 2000). Die Exons 1–3 kodieren für die Signalsequenz und die Cathelin-Domäne, Exon 4 trägt die Information für das reife AMP (Gudmundsson et al. 1996). Direktes Genprodukt ist das Propeptid hCAP-18 (*human cationic antimicrobial protein*, Molekulargewicht 18 kDA), das die Speicherform des humanen Cathelidins darstellt. Aus dem Propeptid hCAP-18 wird zwischen Ala 103 und Leu 104 über die Serin-Protease 3 das antimikrobielle Peptid LL-37 (37 Aminosäuren; N-terminal zwei Leucine) abgespalten (Sørensen et al. 2001). LL-37 besitzt eine positive Nettoladung, ein N-terminales Ende mit stark hydrophilem Charakter und eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur (Zanetti, Gennaro, and Romeo 1995).

LL-37 wird in verschiedenen Zellen der myeloischen Reihe sowie in natürlichen Killerzellen, B- und T-Lymphozyten exprimiert (Agerberth et al. 2000; Dürr, Sudheendra, and Ramamoorthy 2006). Die LL-37-Synthese konnte außerdem in Epithelzellen der Atemwege, des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes sowie in der Haut nachgewiesen werden (Burton and Steel 2009; Bals et al. 1998). Das gleichzeitige Vorkommen des Cathelidins in verschiedenen Immun- und Epithelzelltypen unterstreicht seine Bedeutung bei der Immunabwehr.

### **Wirkung von LL-37**

LL-37 zeigt eine ausgeprägte antimikrobielle Aktivität (minimale Hemmkonzentration (MHK) <10 µg/ml) gegen verschiedene grampositive und -negative Bakterien, darunter auch multiresistente Enterokokken und *Staphylococcus aureus*-Stämme (Turner et al. 1998). Seine mikrobizide Wirkung liegt für viele Entitäten im Bereich synthetischer Antibiotika. Resistenzentwicklungen sind in Anbetracht des phylogenetischen Alters ein selten beschriebenes Phänomen (Bals 2000; Bowdish et al. 2005). Die Bindung an LPS führt zur Neutralisation der Endotoxine und senkt die Letalität durch Sepsis in verschiedenen Tiermodellen (Bucki et al. 2010; Hirata et al. 1994; Cirioni et al. 2006; Van der Meer et al. 1995).

LL-37 wirkt jedoch nicht nur anti-mikrobiell, sondern besitzt weitere Funktionen in der Immunabwehr. Über den FPRL-1-Rezeptor (*formyl peptide receptor-like 1*) agiert LL-37 als chemotaktisches Signal für polymorphkernige Leukozyten und CD4(+)-Lymphozyten (Agerberth et al. 2000; De Yang et al. 2000). Über die Aktivierung dendritischer Zellen und die Stimulation einer durch T-Helfer-Typ1-Zellen (Th1-Zellen) gesteuerten Abwehrreaktion stellt es eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität her (Bowdish et al. 2005; Davidson et al. 2004; Wuerth and Hancock 2011). Dies hat dem AMP LL-37 den Beinamen „Alarmin“ eingetragen (Schauber and Gallo 2007).

Neben seinem chemotaktischen Effekt auf Immunzellen wirkt LL-37 über den FPRL-1-Rezeptor auch auf Endothel- und Epithelzellen und führt zu Vasodilatation, Neovaskularisation und Reepithelialisierung bei Verletzungen (Koczulla et al. 2003; Dürr, Sudheendra, and Ramamoorthy 2006).

Neuere Forschungsergebnisse zeigen zudem, dass auch die Cathelin-Domäne von hCAP-18 über antimikrobielle und zusätzlich auch Protease-inhibierende



Eigenschaften verfügt und somit die Funktion von LL-37 ergänzt (Zaiou, Nizet, and Gallo 2003).

### **Regulation der Expression**

Die Mechanismen der Expressionsregulation von Cathelizidinen sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Aufgrund spezie- und gewebespezifischer Unterschiede zeichnet sich ein komplexes Bild. Als konstitutive Abwehrstrategie wird LL-37 von verschiedenen Zellen kontinuierlich sezerniert. Bestimmte Einflussgrößen führen jedoch zu einer verstärkten Expression über den Basalwert hinaus. So konnte gezeigt werden, dass die Synthese von LL-37 im Darmepithel u. a. über kurzkettige Fettsäuren und die Aktivierung des MAPK-Signalweges gesteuert wird (Schauber et al. 2003). In Epithelzellen führen Stimuli wie Verletzungen, Infektionen oder UV-Bestrahlung über ER-Stress zur NF- $\kappa$ B-induzierten C/EBP-(CCAAT/*enhancer-binding protein*)-Aktivierung der Synthese von LL-37 via MAPK-vermittelter Phosphorylierung. Dagegen kommt es bei ER-Stress in Zellen der myeloischen Reihe nicht zu einer gesteigerten CAMP-Expression (Park et al. 2011). Für die Promotorregion des CAMP-Gens wurden in einigen Spezies außerdem Bindungsregionen für Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, C/EBP- $\beta$ , APRF (*acute phase response factor*)) sowie bindende Sequenzen für IFN- $\gamma$  und ein IL-6-*reponse-element* (IL-6-RE) beschrieben, die eine gesteigerte Transkription des Gens im Zuge der Entzündungsreaktion auslösen (Wu et al. 2000; Gombart, Borregaard, and Koeffler 2005; Frohm et al. 1997; Bals and Wilson 2003). Bei humanen myeloischen Zellen wurden drei *vitamin-D-responsive-elements* (VDRE) sowie Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren APRF und *nuclear-factor*-(NF)-IL-6 beschrieben, eine Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B wurde dagegen nicht detektiert (Frohm et al. 1997; Liu et al. 2009).

#### **1.1.4.3 Mouse cathelicidin related antimicrobial peptide (mCRAMP)**

In der Maus codiert das Cnlp-Gen für mCRAMP ein murines Homolog zum humanen LL-37 (Gallo et al. 1997). Sowohl LL-37 als auch mCRAMP stellen die bisher einzigen in der jeweiligen Spezies detektierten Mitglieder der Cathelizidin Familie dar (Huang et al. 2007). Die Cathelin-Domäne weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit bei verschiedenen Arten auf (Tomasinsig and Zanetti 2005). Die humane und murine Form des Cathelizidins besitzen daneben weitere Gemeinsamkeiten: Beide Formen zeigen eine ähnliche Verteilung im Gewebe bzw. Entsprechungen in der zellulären

Expression, der regulatorischen Funktion und dem mikrobiellen Wirkspektrum (Kurosaka et al. 2005).

## 1.2 Vitamin D

Das endokrine Vitamin-D-System spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels und ist daher essentiell für einen gesunden Knochen- und Zahnaufbau. Neben dieser „klassischen Funktion“ beeinflusst Vitamin D verschiedene physiologische Prozesse in unterschiedlichen Geweben, darunter z. B. im Hirn-, Prostata-, Brust- und Kolongewebe (Eyles et al. 2005; Ching et al. 2011; Lagishetty et al. 2010; Swami, Krishnan, and Feldman 2011). Die Interaktion zwischen Vitamin D und dem Immunsystem stand besonders in den letzten Jahren im Fokus der Forschung.

### 1.2.1 Synthese und Metabolismus

Der tägliche Vitamin-D-Bedarf des menschlichen Körpers kann über zwei Quellen gedeckt werden:

- (1) durch die Aufnahme Vitamin-D-reicher Nahrungsmittel (Milchprodukte, Fisch, Lebertran) und
- (2) durch die endogene Synthese in der Haut bei Sonnenschein.

Bei ausreichender UV-Einstrahlung ist die endogene Synthese für den Großteil der Bedarfsdeckung verantwortlich. Vitamin D erfüllt damit nicht die Kriterien der historischen Definition des Begriffes „Vitamin“, da es vom Körper selbst produziert werden kann. Es stellt vielmehr ein Prohormon dar, das als Secosteroid von den Steroiden abgeleitet werden kann.

Im ersten Schritt der kutanen Synthese wird unter UV-Einstrahlung das vor allem im Stratum basale und Stratum spinosum der Haut vorliegende Provitamin 7-Dehydrocholesterol in Vitamin D3 (auch: Cholecalciferol) umgewandelt (Matsuoka et al. 1989). Der Gehalt an 7-Dehydrocholesterol sowie die Fähigkeit zur Vitamin-D3-Synthese nimmt jedoch mit zunehmendem Lebensalter ab (Holick, Matsuoka, and Wortsman 1989). Die Umwandlung in Vitamin D3 wird über zwei Mechanismen reguliert, um eine Intoxikation bei exzessiver Sonneneinstrahlung zu verhindern. Kurzfristig geschieht dies über die Photolabilität der genannten Reaktionsprodukte, die durch längere Sonneneinstrahlung in eine biologisch inaktive Form umgewandelt

werden (Webb, Decosta, and Holick 1989). Langfristig kommt es zu einer erhöhten Melaninproduktion. Das Pigment führt über Absorption der Sonnenstrahlen zu einer verminderten Syntheseleistung der Haut (Holick 1995).

Über die Nahrung wird entweder Vitamin D<sub>3</sub> oder Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) aufgenommen. Die Resorption findet im Dünndarm statt und ist abhängig von der gleichzeitigen Aufnahme von Nahrungsfetten (Hollander 1981).

Vitamin D<sub>3</sub> gelangt von der Haut oder durch orale Aufnahme in den Blutkreislauf und wird zur Leber transportiert (siehe Abbildung 2). Das lipophile Molekül muss dafür im Blut an ein Transportprotein (Vitamin-D-bindendes Protein (VDBP)) gebunden werden (Haddad et al. 1993). In der Leber erfolgt über verschiedene Hydroxylasen, die zum Cytochrom P450-System gehören (z. B. CYP2R1, CYP2D11 und CYP2D25), die Umwandlung zu 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (auch Calcidiol; 25VitD<sub>3</sub>) (Christakos et al. 2010). Das entstandene 25VitD<sub>3</sub> wird wiederum an VDBP gebunden und stellt mit einer Halbwertszeit von ungefähr 15 Tagen die Vitamin-D-Speicherform dar (Jones 2008). Die Hydroxylierung unterliegt keinen externen Regulationsmechanismen außer einer Produkthemmung. Daher ist sie in erster Linie abhängig von den verfügbaren Vorstufen und spiegelt die aktuelle Versorgung des Organismus mit Vitamin D wider.

Im letzten Schritt der Synthese wird die inaktive Speicherform, 25VitD<sub>3</sub>, in der Niere über das Enzym 1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1) in die biologisch aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (auch Calcitriol; 1,25VitD<sub>3</sub>) umgewandelt. Das renal synthetisierte 1,25VitD<sub>3</sub> wird in den Blutkreislauf abgegeben und erhöht den Kalzium- und Phosphatspiegel des Organismus über eine gesteigerte Resorption im Darm und Reabsorption im distalen Tubulus der Niere. Durch gleichzeitige Aktivierung der Osteoblasten und Hemmung der Osteoklasten kommt es schließlich zu einer Stärkung der Knochensubstanz.

Der Katabolismus von Vitamin D erfolgt über die 24-Hydroxylase (CYP24A1). Sowohl 25VitD<sub>3</sub> als auch 1,25VitD<sub>3</sub> werden über das Enzym durch Hydroxylierung der Seitenketten zu Calcitroidsäure abgebaut, die mit dem Urin ausgeschieden wird. Interessanterweise besitzt das Enzym eine höhere Affinität für 25VitD<sub>3</sub> als für das aktive Hormon ( $K_m$ -Wert um den Faktor 35 niedriger) (Taniguchi et al. 2001).

Die renale Synthese von 1,25VitD<sub>3</sub> ist streng reguliert und wird hauptsächlich durch Parathormon (PTH) und das Serumkalzium bzw. -phosphat gesteuert. Hohe PTH-

Spiegel führen zu einer Aktivierung der enzymatischen Syntheseleistung der CYP27B1 und so zu einer vermehrten Umwandlung von 25VitD3 zu 1,25VitD3 (Murayama et al. 1998). 1,25VitD3 wirkt wiederum hemmend auf die PTH-Synthese und steigert die Expression der katabolen CYP24A1, so dass ein funktioneller Regelkreis entsteht (Suda, Shinki, and Kurokawa 1994; Kim et al. 2007).

Neben diesem „klassischen“ Weg des renalen Vitamin-D-Metabolismus wurden in den letzten Jahren weitere Gewebe und Zellen entdeckt, die über das Enzym CYP27B1 verfügen und somit selbst zur Synthese von 1,25VitD3 in der Lage sind. In mehr als 30 Geweben wurde außerdem der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) nachgewiesen, über den 1,25VitD3 spezifische Wirkungen weit ab von der Kalziumhomöostase entfalten kann (Reichel, Koeffler, and Norman 1989). Über die bekannte endokrine Funktion hinaus fungiert Vitamin D damit auch als parakriner bzw. autokriner Botenstoff.

### **1.2.2 Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR)**

Die Wirkung von 1,25VitD3 wird im jeweiligen Zielgewebe durch die Bindung an den VDR vermittelt. Der humane VDR hat ein Molekulargewicht von ca. 50 kDA und setzt sich aus 427 Aminosäuren zusammen. Das codierende Gen findet sich auf Chromosom 12 und besteht aus 9 Exons (Haussler and Norman 1969). Der Rezeptor gehört zur Familie der Steroid-/Schilddrüsenrezeptoren und wirkt als ein durch Ligandenbindung aktivierter, regulatorischer Transkriptionsfaktor. Wie fast alle Nuklearrezeptoren verfügt er über zwei funktionelle Haupteinheiten:

- 1) eine N-terminale DNA-Bindungs-Domäne, bestehend aus zwei Zink-Fingern, die die Interaktion mit der DNA ermöglichen (codiert auf Exon 1–3) und
- 2) eine C-terminale Liganden-Bindungs-Domäne, die charakteristisch für den jeweiligen Rezeptor ist und neben der Bindung des Liganden die Heterodimerisation und Interaktion mit Co-Aktivatoren der Transkription ermöglicht (codiert auf Exon 8 und 9) (Haussler et al. 1998).

Im Ruhezustand liegt der VDR an das Hitzeschockprotein HSP90 gebunden vor, das durch die Interaktion mit 1,25VitD3 abgespalten wird. Der VDR bindet seinen Liganden mit hoher Selektivität und Affinität (Dissoziationskonstante  $K_d$   $5 \times 10^{-10}$  M),

die biologisch aktive Form des Vitamin D wirkt dabei bis zu 1000-fach potenter im Vergleich zu anderen Vitamin-D-Metaboliten (Weckler and Norman 1980).

Durch die Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Peptides, die eine Heterodimerisation mit dem Retinoid-X-Rezeptor ermöglicht. Der Heterodimer-Komplex bindet an das VDRE, das sich aus Wiederholungen von PG(G/T)TCA-Motiven zusammensetzt (Hausler et al. 1998; Lin and White 2004). Über 220 Gene, die über ein oder mehrere VDREs verfügen, konnten bisher identifiziert werden (Ramagopalan et al. 2010). Durch die Rekrutierung von Co-Aktivatoren (darunter SRC 1-3, NcoA62/SKIP und DRIP) und basalen Transkriptionsfaktoren (z. B. TFIIB) kommt es zur Ausbildung eines Präinitiations-Komplexes (*preinitiation complex*, PIC), der die Positionierung der RNA-Polymerase II erleichtert und damit die Transkription induziert. Gleichzeitig kann es aber auch durch die Rekrutierung von Co-Repressoren (z. B. SMRT, NCoR1, *Hairless* und *Alien*) zu einer Hemmung der Transkription kommen (Hausler and Norman 1969; Pike and Meyer 2010; Polly et al. 2000; Blanco et al. 1995). Die beteiligten Co-Faktoren sind promotor- und gewebespezifisch, wodurch eine differenzierte Induktion und Suppression verschiedener Zielgene in verschiedenen Zellsystemen ermöglicht wird. Zusätzlich tragen regulatorische Regionen, die teilweise weit entfernt vom eigentlichen Zielgen liegen, zur Komplexität der Vitamin-D-Wirkung bei (Meyer et al. 2006; Kim et al. 2006). Diese umfasst neben der bekannten Regulation des Kalziumstoffwechsels auch die Beeinflussung der Differenzierung, Apoptose und funktionalen Aktivität verschiedener Zellarten (Buitrago and Boland 2010).

Vitamin D wirkt daneben auch über nicht-genomische Signalwege, die zur Auslösung sogenannter *rapid non-genomic actions* führen (z. B. zur Öffnung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle). Während genomische Signalwege über intrazelluläre Steroidrezeptoren laufen, sind für die *rapid non-genomic actions* VDRs verantwortlich, die innerhalb von Einbuchtungen in der Plasmamembran liegen (Pike and Meyer 2010). Beide Formen des Vitamin D agieren als äquipotente Liganden dieser VDRs (Menegaz et al. 2011). Auch die Beteiligung anderer Membranrezeptoren wird aktuell diskutiert (Buitrago and Boland 2010).

Hohe Spiegel an 1,25VitD3 führen zu einer gesteigerten Transkription des VDR (Pike and Meyer 2010). Ebenso induzieren PTH und Retinsäure eine gesteigerte Expression des Rezeptors in Osteoblasten, während Glukokortikoide zu einer selektiv

verminderten Expression im Knochengewebe führen (Feldman, Glorieux, and Pike 2005).

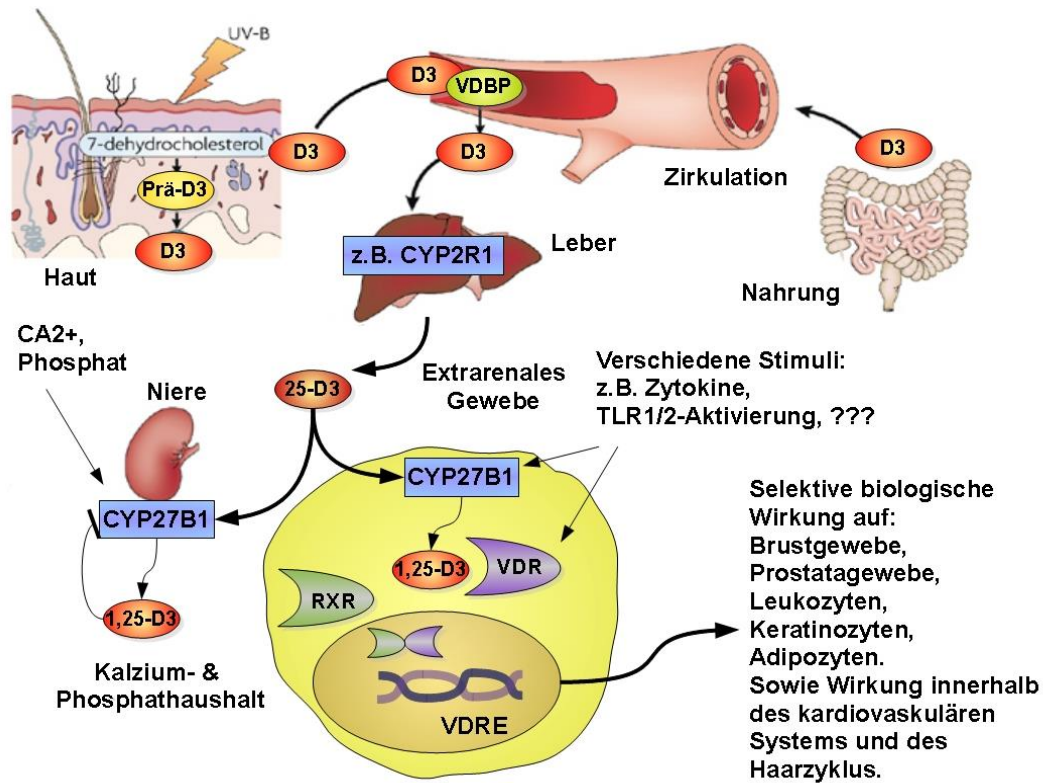


Abbildung 2: Darstellung des Vitamin-D-Metabolismus. Nach endogener Synthese oder exogener Aufnahme gelangt Vitamin D3 zur Leber und wird zu 25VitD3 hydroxyliert. Renal: Die Umwandlung in 1,25VitD3 erfolgt über CYP27B1, reguliert über Serumkalzium, -phosphat und Produkthemmung. Extrarenales Gewebe: Die Umwandlung in 1,25VitD3 wird durch verschiedene Stimuli reguliert z. B. Zytokine. Nach Bindung des Liganden an den VDR kommt es zur Heterodimerisation mit dem Retinoid-X-Rezeptor und Bindung an VDREs. Über die Beeinflussung der Transkriptionsrate entfalten sich komplexe Wirkungen in verschiedenen Geweben. Verändert nach: Deeb, K.K., Trump, D.L. & Johnson, C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nat Rev Cancer 7, 684-700

### 1.2.3 Vitamin D und das angeborene Immunsystem

Im Jahre 1986 belegten Rook und Kollegen, dass die Zugabe von 1,25VitD<sub>3</sub> eine gesteigerte antimikrobielle Aktivität humaner Makrophagen gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* zur Folge hat. Trotz der frühen Entdeckung dieses Zusammenhangs war lange relativ wenig über die direkten Effekte von Vitamin D auf die angeborene Immunantwort bekannt. Erst 2006 wurde durch Liu und Kollegen ein Mechanismus beschrieben, der den Effekt von Vitamin D gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* erklärt. Sie konnten zeigen, dass die Aktivierung des TLR1/2 über PAMPs des Tuberkulose-Erregers eine Induktion des CYP27B1- und des VDR-Gens zur Folge hat (Liu et al. 2006). Diese Beobachtungen liefern die molekulare Basis der Beziehung zwischen dem Vitamin-D-Metabolismus und einer verbesserten Infektabwehr.

Die Wirkung von Vitamin D ist nicht auf Monozyten/Makrophagen beschränkt. Auch in Atemwegeepithelien sowie in Keratinozyten, Trophoblasten und Dezidualzellen kann durch die Co-Stimulation von TLRs und VDR eine vermehrte Ausschüttung von AMP ausgelöst werden (Yim et al. 2007; Schaubert et al. 2007; Liu et al. 2009).

Zusätzlich scheint Vitamin D regulativ auf die Expression verschiedener PRRs einzuwirken. In Monozyten kommt es zu einer Hemmung der TLR4- und TLR2-Expression (Sadeghi et al. 2006). In Epithelzellen und Makrophagen wird die Expression des PRRs NOD2/CARD15/IBD1 (*nucleotide oligomerization domain protein 2/ caspase recruitment domain-containing protein 15/ inflammatory bowel disease 1*) durch Bindung des VDRs im codierenden Gen gefördert (Wang et al. 2010).

### 1.2.4 Extrarenaler Metabolismus von Vitamin D

Die extrarenale 1 $\alpha$ -Hydroxylase unterliegt im Gegensatz zu ihrer renalen Form keiner Hemmung durch negative Feedback-Signale oder einen erhöhten Kalziumspiegel im Serum. Ihre Funktion wird vielmehr durch verschiedene Immunstimuli wie IFN- $\gamma$  oder Interleukine gesteuert (Stoffels et al. 2006).

Wie beschrieben, kommt es über die Aktivierung von TLR1/2 zur Expression der CYP27B1 und des VDRs. Als entscheidende Verbindung zwischen der TLR1/2-Aktivierung und dem Vitamin-D-abhängigen antimikrobiellen Signalweg wurde eine über IL-15-vermittelte Differenzierung der Makrophagen sowie eine Aktivierung der

NF- $\kappa$ B-, JAK-(Januskinase)-STAT- und p38/MAPK-Signalwege beschrieben (Stoffels et al. 2006; Krutzik et al. 2008). Neben der TLR-Aktivierung können auch Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  zu einer Induktion der CYP27B1 im extrarenalen Gewebe führen (van Driel et al. 2006; Stoffels et al. 2006). Um eine gesteigerte Synthese des Enzyms durch Immunsignale zu ermöglichen, ist eine direkte Bindung von C/EBP $\beta$  innerhalb des CYP27B1-Promotors notwendig (Stoffels et al. 2006). Im Gegensatz zu ihrem renalen Pendant wird die extrarenale CYP27B1 weder durch PTH noch durch den Phosphatspiegel beeinflusst (Reichel et al. 1987). Ebenso scheint kein negativer Feedback-Mechanismus über eine erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration oder eine direkte Produkthemmung zu bestehen, sondern nur eine indirekte Kontrolle über die gesteigerte Induktion der CYP24A1 und die beschriebene Inhibition der TLR-Expression in Monozyten.

### **Zellzyklus**

Jenseits der direkten Modulation der Immunantwort nimmt Vitamin D Einfluss auf die Proliferation und Reifung von Zellen. 1,25VitD3 führt zu einem Proliferationsstopp und zur Differenzierung humaner und muriner myeloider Zelllinien (darunter U937, HL-60, THP-1) sowie anderer neoplastischer Zellen (z. B. Brustkrebs-, Darmkrebs- und Prostatakrebszellen) (Gocek and Studzinski 2009).

Über die Modulation der Zelldifferenzierung ergibt sich eine direkte Brücke zwischen der Wirkung auf das angeborene und adaptive Immunsystem. Dies drückt sich z. B. in einer Hemmung der Proliferation von aktivierten T-Helfer- und B-Zellen aus (Dusso, Brown, and Slatopolsky 2005). Außerdem wird die Differenzierung von B-Zellen zu Plasma- oder Gedächtniszellen inhibiert, ebenso die Produktion von Immunglobulinen (Provvedini et al. 1983; Chen et al. 2007). Die Vitamin-D-getriggerte Hemmung der Ausreifung dendritischer Zellen bzw. die Förderung der Ausbildung eines tolerogenen Phänotyps und einer verminderten Expression von HLA-(*human leukocyte antigen*)-DR- und CD4-Rezeptoren auf Makrophagen beeinflusst die T-Zell-Aktivierung (Förderung der Proliferation CD4(+) regulatorischer T-Zellen) (Piemonti et al. 2000; Rigby, Waugh, and Graziano 1990; Penna et al. 2007). Verschiedene in vitro Experimente zeigen zudem, dass Vitamin D vor allem die Funktion von humanen Th1-Zellen inhibiert und bei naiven T-Zellen die Entwicklung eines Th2-Phänotyps mit typischem Zytokinprofil fördert (Boonstra et al. 2001; Lemire et al. 1995). Versuche



mit murinen T-Zellen und VDR-knockout Mäusen bestätigen diese Beobachtungen jedoch nicht und liefern z. T. gegensätzliche Ergebnisse (Zittermann 2003).

### 1.2.5 Referenzwerte für den Vitamin-D-Status

Erst in den letzten Jahren wurden offizielle Referenzwerte veröffentlicht, z. B. 2011 vom Institute of Medicine (IOM) oder 2003 vom Scientific Committee on Food (SCF) im Auftrag der Europäischen Union. Mehrheitlich wird ab 25VitD3-Werten unter 40–50 nmol/l (< 20 ng/ml; Umrechnungsfaktor ng/ml x 2,5 = nmol/l) von einem manifesten Vitamin-D-Mangel gesprochen. Als Goldstandard zur Beurteilung des Vitamin-D-Status gilt dabei die Messung der 25VitD3-Konzentration im Blut (Aloia 2011).

Welche Vitamin-D-Konzentrationen für gesunde Erwachsene als optimal zu betrachten sind, wird dagegen aktuell kontrovers diskutiert. Für viele Autoren liegt der Bereich der optimalen Versorgung zwischen 80 –100 nmol/l (32–40 ng/ml) bzw. nach den Richtlinien der amerikanischen endokrinologischen Gesellschaft sogar zwischen 100–130 nmol/l (40–60 ng/ml) (M. F. Holick et al. 2011). Werte zwischen 50 und 75 nmol/l (20 -30 ng/ml) werden entsprechend als eine Vitamin-D-Insuffizienz gewertet (Hollis 2005; Dawson-Hughes et al. 2005; Vieth 2006). Die Basis dieser Grenzwertfestlegung bilden randomisierte klinische Studien zur Knochenmineralisierung und Frakturprävention sowie Beobachtungen zu verschiedenen Biomarkern z. B. PTH, Kalziumresorption im Darm, Knochendichtemessung, verminderte Insulinsekretion durch B-Zellen sowie die Beeinträchtigung der Immunantwort bei Serumkonzentrationen unterhalb von 75 nmol/l (Heaney et al. 2003; Lips et al. 1988; Lee et al. 1994; Liu et al. 2006).

Der 2011 veröffentlichte Bericht des IOM zu Referenzwerten für die Nahrungsaufnahme von Kalzium und Vitamin D (*Consensus Report: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*) widerspricht jedoch diesen Einschätzungen. Seine Empfehlungen sehen Konzentrationen > 50 nmol/l (> 20 ng/ml) als ausreichend für einen gesunden Knochenaufbau und die allgemeine Gesundheit an. Werte > 75 nmol/l (> 30 ng/ml) haben keinen zusätzlichen positiven Effekte auf die Gesundheit. Zur Formulierung neuer Empfehlungen fehlen laut IOM weitere Studien, die eine negative Beeinflussung des Immunsystems durch unzureichende Vitamin-D-Spiegel nachweisen (Anon 2011).

### **1.2.6 Vitamin-D-assoziierte Erkrankungen**

Eine Vitamin-D-Insuffizienz kann mit der Prävalenz verschiedener Krankheiten in Verbindung gebracht werden, bei denen Störungen der Immunreaktion zugrunde liegen. So zeigt sich eine Assoziation zwischen erniedrigten Vitamin-D-Spiegeln und der Multiplen Sklerose, Diabetes mellitus Typ 1, Morbus Crohn, kardiovaskulären Erkrankungen und Sepsis (Hewison 2010; Herr, Shaykhiev, and Bals 2007; Jeng et al. 2009). Daneben scheint auch die Anfälligkeit für Infektionen durch niedrige Serumkonzentrationen von 25VitD3 gefördert zu werden.

Studien deuten auf eine Verbindung zwischen erniedrigten Vitamin-D-Spiegeln und saisonaler Grippe bzw. Erkrankungen der oberen Atemwege hin (Cannell et al. 2006; Bartley 2010). Schulkinder, die im Rahmen einer randomisierten, doppel-blinden Studie eine Vitamin-D-Supplementation erhielten, erkrankten mit einer 42 % niedrigeren Wahrscheinlichkeit an Infektionen der oberen Atemwege als Kinder im Placebo-Arm (Urashima et al. 2010). Bei Patienten mit Grunderkrankungen der Lunge scheint dieser Zusammenhang noch stärker ausgeprägt zu sein. So konnten Ginde et al. zeigen, dass Patienten mit niedrigem Vitamin-D-Level und COPD doppelt so häufig von Infekten betroffen sind (Ginde, Mansbach, and Camargo 2009). Eine aktuelle Studie von Janssen et al. bestätigt eine signifikante Häufung von Vitamin-D-Defizienz unter COPD-Patienten und eine negative Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Serumkonzentration von 25VitD3 (Janssen et al. 2009).

### **1.2.7 Zigarettenrauch als Einflussfaktor auf die Immunfunktion**

In den Industrieländern ist das Rauchen von Zigaretten einer der wichtigsten vermeidbaren Risikofaktoren für die Entwicklung einer Reihe von Krankheiten, darunter kardiovaskuläre, neoplastische und respiratorische Erkrankungen. Eine Vielzahl dieser Gesundheitsprobleme korreliert mit einer Beeinträchtigung der Immunfunktion. Der durch Nikotinkonsum induzierte oxidative Stress und eine chronische Entzündungsreaktion führen zur Schädigung des Gewebes und sind damit an der Entwicklung der durch Rauchen verursachten Atemwegenerkrankungen beteiligt. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Zigarettenrauch die TLR-Expression von Makrophagen steigert und über die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges zu einer erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt, während antiinflammatorische Mediatoren unterdrückt werden (Yang et al. 2006; Kent et al. 2008; Zhou et al. 2011). Die molekularen Mechanismen dieser Wirkung sind zum

---

großen Teil noch nicht verstanden. Die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur zu dieser Thematik sind u. a. auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen (van der Vaart et al. 2004).

Raucher sind darüber hinaus anfälliger für Infektionen des Respirationstraktes wie Influenza, Tuberkulose und Pneumonie (Herr et al. 2008). Neben der Schädigung des Lungenepithels und der Beeinträchtigung der mukuziliären Clearance könnte dafür die Hemmung der Produktion und Funktion von AMPs verantwortlich sein. So detektierten Herr et al. eine verminderte Ausschüttung des hBD-(*human beta-defensin*)-2 durch Zigarettenrauch in vitro und erniedrigte hBD2-Level in der pharyngealen Spülflüssigkeit von Rauchern (Herr et al. 2008).

## 2 Fragestellung

Neben seiner „klassischen“ Funktion im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel scheint Vitamin D eine entscheidende Rolle für die Regulation des Immunsystems zu spielen. Die molekularen Mechanismen der Vitamin-D-Wirkung auf das Immunsystem sind bisher nur teilweise verstanden.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Einflusses von Vitamin D auf verschiedene Funktionen des angeborenen Immunsystems nach Kontakt mit bakteriellen Pathogenen.

Im Fokus stand dabei:

- 1) die Beeinflussung primärer humaner Makrophagen und neutrophiler Granulozyten durch Vitamin-D-Stimulation bezüglich der Expression des humanen Cathelidins LL-37, der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Aktivatoren sowie der Elimination von lebenden Bakterien.
- 2) die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Vitamin D und den beobachteten Effekten.
- 3) der Vergleich der Reaktion verschiedener Zellen (immortalisierte Monozyten-Zelllinien, humane und murine Makrophagen, neutrophile Granulozyten) auf Stimulation mit Vitamin D.
- 4) der Einfluss von Zigarettenrauch auf die Interaktion von Vitamin D und der angeborenen Immunantwort

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Lösungen und Puffer

##### 3.1.1.1 Allgemein

<b>MACS-Puffer</b>	2 mM	EDTA
	0,5 % (w/v)	BSA
	auf 500 ml	PBS
	Lagerung bei 4 °C	
<b>Red blood cell lysis-Puffer</b>	4,15 g	NH <sub>4</sub> Cl
	0,59 g	KHCO <sub>3</sub> ,
	0,1 ml	EDTA
	auf 500 ml	PBS
	pH= 7,2–7,4 eingestellt mit HCl	
Lagerung bei 4 °C		
<b>Trypanblau-Lösung</b>	0,2 % (w/v)	Trypanblau
	0,9 % (w/v)	NaCl
	in PBS	
<b>Trypsin/EDTA-Lösung</b>	0,25 % (w/v)	Trypsin
	2 mM	EDTA
	in PBS	

### 3.1.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

<b>Agarose-Gel (2 %)</b>	3 g	Agarose
	8 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
	auf 150 ml	TBE-Puffer (1x)
<b>TBE-Puffer (10x)</b>	121,1 g/l	Tris
	3,72 g/l	EDTA
	51,53 g/l	Borat
	auf 1000 ml	Aqua bidest.
	pH = 8,0 eingestellt mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
	Lagerung bei RT	

### 3.1.1.3 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

<b>ELISA-Beschichtungspuffer:</b>	0,42 g	NaHCO <sub>3</sub>
	auf 100 ml	H <sub>2</sub> O
	pH = 9,6 eingestellt mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
	Lagerung bei 4 °C	
<b>ELISA-Blocking-Reagenz:</b>	27 g	Blocking-Reagenz
	auf 100 ml	Aqua bidest.
	zu 3 ml aliquotiert	
	Lagerung bei -20 °C	
<b>ELISA-Diluent:</b>	1 g	BSA
	auf 100 ml	PBS
	Lagerung bei 4 °C	

---

<b>ELISA-Waschpuffer:</b>	1 ml	Tween™ 20
	auf 1000 ml	PBS
	Lagerung bei RT	

### 3.1.1.4 Lösungen für SDS-Page und Western-Blot

<b>SDS-Page Elektrodenpuffer (Laufpuffer):</b>	9 g	Tris
	43,2 g	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
	auf 600 ml	Aqua bidest.
	pH = 8,3 eingestellt mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
	Lagerung bei 4 °C	

<b>Western-Blot-Transferpuffer (1x)</b>	3,03 g	Tris
	14,4 g	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	auf 1000 ml	Aqua bidest.
	pH = 9,2 eingestellt mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	

<b>TBS-Puffer (10x)</b>	24,2 g	Tris
	80 g	NaCl
	auf 1000 ml	Aqua bidest.
	pH = 7,6 eingestellt mit HCl	
	Lagerung bei 4 °C	

<b>TBST (TBS + Tween™ 20)</b>	0,1 % (v/v)	Tween™ 20
	auf 1000 ml	TBS (1x)

### 3.1.2 Chemikalien

25-Hydroxyvitamin D3	Sigma-Aldrich
1,25-Dihydroxyvitamin D3	Sigma-Aldrich
Acrylamidlösung	Roth
Agar	BD Difco
Agarose	Invitrogen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Blocking-Reagens	Roche
BSA (Bovines Serumalbumin)	BioRad
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbeccos' s modified Eagle' s Medium)	Gibco
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
Entwickler-Stammlösung	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
EDTA Disodium Salt	Sigma-Aldrich
FastRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use; 50–1500 bp	Fermentas
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	Gibco
Ficoll-400 (400kDA)	Sigma-Aldrich
Ficoll-Hypaque	Biochrom AG
Fixierer-Stammlösung	Sigma-Aldrich
Glukose	Sigma-Aldrich
Glutamax II	Gibco



---

Glyzerin	Roth
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth
HCl	Roth
Humanes Serum, gepoolt	Sigma-Aldrich
KHCO <sub>3</sub>	Roth
M-CSF	Calbiochem
Milchpulver	Roth
M-MuLV-RT	Fermentas
NAA	Gibco
NaCl	Roth
Nährbouillon	BD Difco
NaOH	Merck
NH <sub>4</sub> Cl	Roth
Oligo(dT)18-Primer	Qiagen
OPI-Medienzusatz	Sigma-Aldrich
Orange Loading Dye	Fermentas
Pam3CSK4	Invivogen
PBS	PAA
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich
PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate)	Sigma-Aldrich
RNaseZap	Ambion Applied Biosystems
Roti-Load™ loading buffer	Roth
RPMI-(Roswell Park Memorial Institute) -Medium	Gibco
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	Roth
SDS-Gelplatten	BioRad

## ABsolute™ QPCR SYBR®

Green Mastermix	Abgene
Tris	AppliChem
Triton-X 100	Fluka
Trypanblau Färbelösung (0,4%)	Sigma-Aldrich
Tween™ 20	Fluka

**3.1.3 Zellmedien**

<b>Medium für Makrophagen:</b>	500 ml	DMEM-GlutaMax II
	0,1 mM	NAA
	10 %	FCS
	1 %	P/S-Lösung
<b>Medium für neutrophile Granulozyten:</b>	500 ml	PBS
	0,5 g	Glukose
	0,5 g	BSA
<b>Medium für U937-Zellen:</b>	500 ml	RPMI 1640
	10 %	FCS
	1 %	P/S-Lösung
<b>zur Differenzierung zusätzlich mit:</b>	0.05 mmol/l	L-Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
<b>Medium für MonoMac6-Zellen:</b>	500 ml	RPMI 1640
	10 %	FCS
	1 %	P/S-Lösung
	0,05 mmol/l	L-Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
	OPI-Mediumzusatz	

<b>Medium für murine Makrophagen:</b>	500 ml	RPMI 1640
	10 %	FCS
	1 %	P/S-Lösung
<b>Medien für Bakterien:</b>	8 g	Nährbouillon
	→ auf 1000 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt, autoklaviert.	
	5,74 g	Nähragar
	→ auf 250 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt, autoklaviert.	

### 3.1.4 Reaktionssysteme und Geräte

6- bzw. 12-well-Platten	Sigma-Aldrich
10–20 % Tris-Tricin-Gele	Anamed
96-Loch-Mikrotiterplatten	Maxisorp, Nunc
Bakterien-Brutschrank	Thermocult
BCA™ Protein Assay Kit	BioRad
CCD-Kamera	Visitron
Cytospin-Zellzentrifuge	Thermo Scientific
ECL-System-Kit	Pierce
ELISA Kit-Systeme	R&D Systems
First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
Gradientengel	BioRad
GraphPad Prism 5.2	GraphPad Software
ImageJ-Image Processing and Analysis in Java	Open Source Software
iCycler	BioRad

---

MACS® CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec
Magellan™ – Data Analysis Software	Tecan
Microsoft Excel XP	Microsoft Corporation
Millipore membrane filters / pore size 0,22 µm	Millipore
Neubauer-Zählkammer	Roth
Nitrocellulose-Membran 0,45 µm	BioRad
NucleoSpin® RNA II System	Macherey-Nagel
Photometer Ultrospec 2100 pro UV	Biochrom
Röntgenfilm	Agfa
Tank-Blotting Apparatur	BioRad
Tecan Ultra 384 Reader	Tecan
Thermoblock	Eppendorf AG
Zellinkubator	Thermo Scientific
Zellkulturflaschen / 75 cm <sup>2</sup>	Sigma-Aldrich
Zellkulturschalen	Sigma-Aldrich
Zentrifuge	Thermo Scientific

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Methoden der Zellkultur

Für die Arbeiten in der Zellkultur wurden ausschließlich steril verpackte oder autoklavierte Materialien verwendet. Durch regelmäßige Reinigung und Desinfektion der Brutschränke sowie regelmäßig gereinigte, desinfizierte und mit UV-Licht bestrahlte Arbeitsbänke wurde eine keimarme Bearbeitung der Zellen gewährleistet.

#### 3.2.1.1 Präparation humaner Monozyten

Humane Monozyten wurden per Dichtezentrifugation aus Blutspende-Präparaten gesunder Spender isoliert (Blutbank des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen). Um eine hohe Zellzahl zu erhalten, wurden Buffy-coats verwendet. Buffy-coats entstehen als Nebenprodukt bei der Verarbeitung von Vollblutpräparaten zu Erythrozytenkonzentraten und gefrorenem Frischplasma und enthalten Leukozyten in hohen Konzentrationen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, falls nicht anders festgehalten.

Über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten (Ficoll unter Zusatz von Diatrizoat; Dichte = 1,077 g/ml) wurde durch Zentrifugation (30 min, 1.500 U/min, ohne Bremse, 4 °C) ein Großteil der Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) getrennt. Die Interphase mit den PBMCs wurde aufgenommen, resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 1.300 U/min, 4 °C). Das Zellpellet wurde mit *red blood cell lysis*-Puffer behandelt. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 50 ml MACS-Puffer (5 min, 1.100 U/min, 4 °C). Durch die Verwendung eines magnetischen Zelltrennungssystems (MACS® CD14 MicroBeads, human) wurden Monozyten von noch vorhandenen Granulozyten und dendritischen Zellen getrennt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und jeweils  $10^6$  Zellen/ml in Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurde der Überstand mit nicht-adhärenenten Zellen entfernt, die Zellen gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

Um die Reinheit der gewonnenen Monozyten zu testen, wurde eine Cytospin-Präparation durchgeführt und die Viabilität mittels Trypanblau-Färbung festgestellt. Der erreichte Reinheitsgrad der isolierten Monozyten betrug mehr als 95 %.

### 3.2.1.2 Präparation humaner neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus peripherem Vollblut gepoolter Spender gewonnen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, um eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zu verhindern und die Viabilität zu erhöhen. Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS und 2 mM EDTA versetzt und über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten durch Zentrifugation (20 min, 1.200 U/min ohne Bremse, 4 °C) in zwei Phasen getrennt. Die neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten sinken im Ficoll-Gradienten nach unten, die PBMCs verbleiben in der Ficoll/Serum-Interphase (siehe oben). In einem zweiten Schritt wurde über einen Dextran-Gradienten eine Auftrennung der neutrophilen Granulozyten und der Erythrozyten erreicht. Die obere Phase des Ficoll-Gradienten wurde verworfen, das verbleibende Volumen mit PBS auf 25 ml aufgefüllt, wiederum mit 25 ml einer 1 % Dextran-Lösung vorsichtig vermischt und eine Stunde inkubiert. Die obere der zwei entstehenden Phasen wurde entnommen, mit PBS resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 1.300 U/min, 4 °C). Das Zellpellet wurde für 5 min mit *red blood cell lysis*-Puffer inkubiert. Der letzte Waschschrift wurde zweimal wiederholt, bevor die isolierten neutrophilen Granulozyten im Kulturmedium ausgesät wurden.

### 3.2.1.3 Präparation muriner Makrophagen

Die verwendeten murinen Makrophagen wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Sadek Al-Alwani bereitgestellt und nach folgendem Protokoll gewonnen:

Murine Makrophagen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert, die unter Pathogen-freien Bedingungen und gemäß den Richtlinien für Tierexperimente im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrums der Universität Marburg gehalten wurden.

Durch die intraperitoneale Injektion von 1 ml steriler Thioglykolat-Bouillon (Konzentration 4 %) wurde eine verstärkte Einwanderung von mononukleären Zellen in die Bauchhöhle provoziert. Nach drei Tagen wurden die Tiere getötet und die Zellen durch zweimalige Peritoneallavage mit 10 ml eiskalter PBS-Lösung gewonnen. Erythrozyten wurden durch Verwendung von *red blood cell lysis*-Puffer entfernt. Die mononukleären Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellentnahme erfolgte nach Zustimmung des Regierungspräsidiums Gießen.

#### 3.2.1.4 Kultivierung primärer Zellen

Die gewonnenen primären Zellen wurden in dem unter Kapitel 3.1.3 beschriebenen Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

*Monozyten/Makrophagen:* Die isolierten Monozyten wurden durch die Supplementierung von 50 ng/ml M-CSF für sechs Tage zu Makrophagen differenziert. Nach Ablauf dieser sechs Tage wurden die adhärenen Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min inkubiert, die Reaktion mit FCS abgestoppt und die Zellen anschließend mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschalen gelöst. Die gelösten Makrophagen wurden in Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in serumfreiem Medium resuspendiert und für die Versuche in einer Zelldichte von 10<sup>6</sup> Zellen/ml auf 6- oder 12-well-Platten ausgesät.

*Granulozyten:* Da die Lebenszeit von Granulozyten stark beschränkt ist, wurden die Zellen nach der Präparation direkt für die Versuche weiter verwendet und nicht länger als 24 h in Kultur gehalten. Dazu wurden die Zellen in einer Zelldichte von 10<sup>5</sup> Zellen/ml auf 12-well-Platten in Kulturmedium ausgesät.

*Murine Peritonealmakrophagen:* Murine Makrophagen wurden in einer Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen/ml in 12-well-Platten in Kulturmedium ausgesät. Eine Adhärenz war nach 3 h erreicht. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS, um restliche nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.

#### 3.2.1.5 Kultivierung von Zelllinien

*U937:* Die humane histiozytäre Zelllinie U937 konnte 1976 von Sundström und Nilsson aus dem generalisierten Lymphom eines Patienten gewonnen werden (Sundström and Nilsson 1976)

*MonoMac6:* Die humane promyeloische Zelllinie MonoMac6 wurde 1985 von Ziegler-Heitbrock und Riethmüller aus dem Blut eines Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert (Ziegler-Heitbrock et al. 1988).

Beide Zelllinien wurden in entsprechendem Kulturmedium (siehe Kapitel 3.1.3) in Zellkulturflaschen (Volumen: 75 cm<sup>2</sup>) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

Für die Kultur der nicht adhärenen MonoMac6 wurden die Zellen in einer Dichte von 2x10<sup>5</sup> Zellen/ml ausgesät. Nach zwei bis drei Tagen wurde die Zell-Suspension in 15 ml Reaktionsgefäße überführt, abzentrifugiert (5 min, 400 U/min, RT), in PBS

gewaschen und nach dem Bestimmen der Zellzahl neu ausgesät. Die Zellen wurden dreimal die Woche im Verhältnis 1:5 in frisches Medium übertragen, die maximale Passagenanzahl betrug hierbei zwölf.

Die Differenzierung der U937 erfolgte in 12-well-Platten unter Zugabe von 10 nM PMA für 24 h (Spittler et al. 1997). Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zur weiteren Differenzierung über 24 h im Anzuchtmedium mit L-Glutamin in niedriger Konzentration (0,05 mol/l) inkubiert. Durch die Stimulation mit PMA kommt es zur Expression von Differenzierungsmarkern, die als charakteristisch für die aus dem Blut stammenden inflammatorischen M1-Makrophagen gelten (Verhoeckx et al. 2004).

Für die Versuche wurden die ausdifferenzierten, adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit FCS abgestoppt, die Zellen aufgenommen, zentrifugiert und nach einem Waschschrift mit PBS in serumfreiem Medium resuspendiert.

### **3.2.2 Stimulationsexperimente**

Um den Einfluss von Vitamin D auf die angeborene Immunantwort zu untersuchen, wurden Stimulationsexperimente mit primären humanen Makrophagen, den beiden Zelllinien U937 und MonoMac6 (als häufig verwendete Modell-Zelllinien für primäre Monozyten/Makrophagen) und murinen Makrophagen durchgeführt. Als weitere wichtige Komponente der angeborenen Immunantwort wurden primäre humane neutrophile Granulozyten analysiert. Nach Stimulation mit Vitamin D und Aktivierung durch PAMPs wurde die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und die Induktion des Cathelizidins LL-37 bestimmt. Abhängig vom Versuch wurden die Ansätze doppelt oder dreifach angelegt. Da FCS Vitamin D in verschiedenen Konzentrationen enthalten kann, wurden für die Stimulationsexperimente serumfreie Bedingungen gewählt, um einheitliche Versuchskonditionen sicherzustellen.

#### **3.2.2.1 Stimulation humaner Makrophagen**

Ausdifferenzierte humane Makrophagen wurden auf 12-well-Platten in einer Dichte von  $10^6$  Zellen/ml pro Kulturschale ausgesät und mit dem TLR1/2-Liganden Pam3CSK4 (Konzentration 10 nM) für 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h inkubiert. Durch die Messung von VDR-mRNA (*messenger-ribonucleic acid*) in der qRT-PCR



(*quantitative real-time PCR*) wurde die Induktion der Expression des VDR durch TLR1/2-Liganden im Zeitverlauf bestimmt.

Um den Einfluss von Vitamin D auf humane Makrophagen zu untersuchen, wurden die Zellen ebenfalls auf 24-well-Platten in einer Dichte von  $10^6$  Zellen/ml je Kulturschale in serumfreiem Medium ausgesät und für 2 h mit 10 nM des TLR1/2-Liganden Pam3CSK4 stimuliert. Im Anschluss wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h mit  $10^{-7}$  M 25-VitD3 bzw. 1,25-VitD3 behandelt (gelöst in 70 % Ethanol, Konzentration = 100 nmol/l bzw. 40 ng/ml). Für weitere Versuche wurden die Zellen unter den oben geschilderten Konditionen mit Vitamin D stimuliert und anschließend zusätzlich für 4 h mit hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 oder LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml inkubiert.

Nach Stimulation wurden die Zellüberstände abgenommen und die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8) über ELISA bestimmt. Die Expression von hCAP-18-mRNA wurde per qRT-PCR gemessen.

Um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Vitamin D und der gemessenen Expression von hCAP-18-mRNA bzw. der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu ermitteln, wurde Vitamin D in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die erreichten Endkonzentrationen lagen zwischen 25 nmol/l und 130 nmol/l und deckten damit sowohl physiologische als auch unphysiologisch erniedrigte und erhöhte Vitamin-D-Spiegel ab.

Als Kontrollen dienten Proben, die mit Pam3CSK4 und einem entsprechenden Volumen Ethanol oder nur mit Ethanol inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte für alle Proben und alle Schritte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

#### 3.2.2.2 Stimulation humaner neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden direkt nach der Isolation in Medium aufgenommen und in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen/ml auf 12-well-Platten verteilt. Die Stimulation erfolgte mit dem TLR1/2-Liganden Pam3CSK4 und Vitamin D in den für Makrophagen beschriebenen Konzentrationen. Die Inkubationszeit mit Vitamin D betrug in den ersten Versuchen parallel zum Vorgehen bei humanen Makrophagen 24 h. In späteren Versuchen wurde eine verkürzte Inkubationszeit von 2 h bzw. 3 h gewählt. Nach Ablauf der Stimulation wurde in den Überständen mittels ELISA die Konzentration proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) bestimmt und über SDS-

PAGE und Western-Blot der Gehalt an LL-37. Die hCAP-18-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht.

### 3.2.2.3 Stimulation muriner Makrophagen

Murine Makrophagen wurden in einer Dichte von  $10^5$  Zellen/ml auf 12-well-Platten ausgesät. Nach 3 h wurden nicht-adhärenente Zellen durch vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellkonzentration wurde erneut überprüft.

Die Makrophagen wurden entsprechend den Stimulationsbedingungen für humane Zellen behandelt. Im Anschluss wurde über ELISA die Konzentration proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC (*chemokine C-X-C motif ligand 1/keratinocyte chemoattractant*)) im Zellüberstand gemessen und die Induktion von mCRAMP-mRNA per qRT-PCR bestimmt.

### 3.2.2.4 Stimulation der Zelllinien

MonoMac6-Zellen wurden aus der Kulturflasche entnommen und zentrifugiert (5 min, 1500 U/min, RT). Danach wurden die Zellen in Kulturmedium ohne Zusatz von FCS resuspendiert. Ausdifferenzierte adhärenente U937-Zellen wurden mit Trypsin gelöst und ebenfalls in serumfreiem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer wurden gleiche Volumina der Zellsuspension in die Vertiefungen der Zellkulturplatten pipettiert. Für jeden Zellansatz betrug die Konzentration dabei  $10^6$  Zellen/ml in 12-well-Platten. Im Falle von U937 wurden nicht-adhärenente Zellen nach 24 h durch vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt und die Zellkonzentration mikroskopisch erneut überprüft. Im Weiteren wurden die Zelllinien gemäß den unter Kapitel 3.2.2 beschriebenen Konditionen für primäre humane Makrophagen behandelt.

### 3.2.3 RNA-Präparation

RNA liegt in der Zelle in Form eines Einzelstranges vor. Die Einzelstrangform ist im Gegensatz zur Doppelhelix weniger stabil und ermöglicht in der Zelle den Abbau der ständig neu gebildeten RNA durch RNAsen. Da RNAsen ubiquitär vorhanden sind (so z. B. im Schutzfilm der Haut), müssen bei der Isolation und Verarbeitung von RNA besondere Vorkehrungen getroffen werden. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, die verwendeten Materialien waren sterilisiert oder autoklaviert, und es wurde nur DEPC-behandeltes destilliertes Wasser verwendet. Die Arbeitsfläche wurde vor jeder Isolation mit RNaseZap gereinigt.

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus den Zellen wurde das NucleoSpin® RNA II Kit System verwendet. Das Grundprinzip des Kits beruht auf der „single-step“-Methode, die erstmals von Chomczynski und Sacchi beschrieben wurde (Chomczynski and Sacchi 1987). Nach der Stimulation der Zellen wurde das Kulturmedium entfernt oder für ELISA-Untersuchungen in Eppendorfgläser überführt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit warmem PBS gewaschen. Mit einem Lysepuffer (enthält Guanidinisothiocyanat) wurden die Zellen lysiert, Proteine denaturiert und RNAsen deaktiviert. Die Proben wurden anschließend in ein Säulensystem pipettiert, wo die enthaltenen Nucleinsäuren über eine Silikamembran gebunden wurden. Die an die Membran gebundene DNA wurde anschließend über einen DNase-Verdau entfernt. Über mehrere Waschschrte wurden verbleibende Zellkomponenten und Salze entfernt und im letzten Schritt die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die isolierten Nucleinsäure-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

#### **3.2.4 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Der RNA-Gehalt der Proben wurde für die Umschreibung in cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*) mittels eines Photometers bestimmt. Die Konzentration der enthaltenen RNA ist proportional zur Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm ( $OD_{260}$ ). 2 µl der Probe wurden mit 98 µl destilliertem Wasser versetzt (Verdünnung 1:50). Anhand der gemessenen Extinktion wurde die Konzentration der Probe bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurde der Koeffizient der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen 280 nm berechnet ( $\text{Extinktion-}OD_{260} / \text{Extinktion-}OD_{280}$ ). Reine RNA weist einen Quotienten von ca. 1,8 auf. Werte über 2 lassen auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen und/oder DNA schließen. Für alle weiteren Schritte sollte die gleiche Menge an RNA verwendet werden. Deshalb wurden die Proben auf die niedrigste gemessene Konzentration normalisiert; die Grenzwerte lagen zwischen 1 µg/10 µl als maximale und 500 ng/10 µl als minimale Konzentration.

#### **3.2.5 cDNA-Synthese**

Die normale Transkriptionsrichtung der Zelle führt über DNA als Matrize zur Bildung von RNA. Die Synthese von cDNA aus RNA verläuft damit gegen die natürliche Transkriptionsrichtung und kann nur über zellfremde Enzyme ermöglicht werden. Mit Hilfe einer viralen Transkriptase kann RNA in cDNA umgeschrieben werden. Reverse Transkriptasen (RT) sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die zuerst in Retroviren

entdeckt wurden und diesen zur Umschreibung der eigenen RNA in Wirts-DNA dienen. Für alle durchgeführten RNA-Umschreibungen wurde in dieser Arbeit M-MuLV RT (*moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) verwendet.

In den durchgeführten Versuchen sollte die durch Vitamin D getriggerte Induktion spezifischer mRNA untersucht werden. Deshalb wurden für die cDNA-Synthese Oligo(dT)18-Primer verwendet, die sich spezifisch an das 3'-Ende des Poly-A-Schwanzes der mRNA anlagern.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für jede Umschreibung wurde 500 ng bis 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 µl eingesetzt, 1 µl Oligo(dT)18-Primer hinzugegeben und 5 min auf 65 °C erhitzt. Nach einer Inkubation bei 4 °C für 10 min erfolgte die Zugabe von 9 µl eines Mastermix mit folgender Zusammensetzung:

Mastermix: 4 µl 5 x reaction buffer  
1 µl RiboLock RNase inhibitor (20 U/µl)  
2 µl dNTP (10 mM)  
2 µl M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µl)

Der Ansatz aus RNA und Mastermix wurde weitere 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min auf 70 °C erhitzt. Die synthetisierte cDNA wurde mit 180 µl sterilisiertem Wasser versetzt und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.6 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) und Gelelektrophorese**

Die PCR ist eine 1983 von Kary Mullis entwickelte Methode, die erstmals die Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte *in vitro* ermöglichte (Mullis and Faloona 1987). Das Prinzip der PCR beruht auf der Replikation bestimmter DNA-Abschnitte durch eine Polymerase. Die Polymerase katalysiert die Bildung eines komplementären Strangs entlang einer vorhandenen DNA-Matrize. Als Startpunkt der Synthese wird dabei immer ein freies 3'-Hydroxyende benötigt.

Für die Durchführung einer PCR werden spezielle Nukleotidsequenzen – sogenannte Primer – verwendet. Primer weisen ein freies 3'-Hydroxyende auf, an dem die Polymerase anknüpfen kann. Durch die Herstellung von Primern mit

Nukleotidsequenzen, die selektiv an bestimmte Stellen der DNA binden, ist die gezielte Replikation bestimmter DNA-Abschnitte möglich.

Die in dieser Arbeit verwendete qRT-PCR stellt eine Erweiterung dieses Grundprinzips dar, die zusätzlich eine quantitative Bestimmung ausgewählter DNA-Sequenzen ermöglicht. Über die Zugabe von interkalierenden, fluoreszierenden Substanzen kann die Menge des bei jedem Zyklus entstehenden doppelsträngigen DNA-Produkts anhand des Anstiegs der Fluoreszenz bestimmt werden.

Jede PCR-Reaktion wurde mit 5 µl der vorher mit DEPC-Wasser 1:10 verdünnten cDNA durchgeführt. Dem Ansatz wurden zusätzlich 12,5 µl Absolute™ qPCR SYBR® Green Fluorescein Mastermix und je 1 µl des gewünschten Primerpaares hinzugegeben und das Volumen mit sterilisiertem Aqua bidest. auf 25 µl aufgefüllt. Alle Ansätze wurden mittels eines iCycler mit dem in Tabelle 1 aufgelisteten Protokoll analysiert:

**Tabelle 1: PCR-Bedingungen**

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Repeats
Polymerase-Aktivierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	40 sec	1
Primer-Anlagerung	60 °C	40 sec	
Extension	72 °C	40 sec	40
Finale Extension	72 °C	6 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	1
Start-Temperatur	55 °C	1 min	1
Schmelzkurve	55 °C	10 sec	1
	ab 2. Wiederholung		80
	+0.5 °C/Zyklus		
	4 °C	HOLD	

Jede PCR wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten Proben ohne Reverse Transkriptase und reines Wasser. Die relative Expression wurde mittels der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet (Livak and Schmittgen 2001; Gibson, Heid, and Williams 1996). Der CT-(*cycle threshold*)-Wert gibt den Zyklus der PCR an, bei dem zum ersten Mal ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz über einen Grundwert hinaus detektiert werden kann. Er markiert gleichzeitig den Bereich der exponentiellen Amplifikation. Zunächst wurde die Differenz der CT-Werte des gesuchten PCR-Produktes (=  $\Delta\text{CT}$ -Wert) zu den CT-Werten eines Haushaltsgens berechnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für humane Proben die 18S-rRNA (18S-*ribosomal-ribonucleic acid*) und für murine Proben  $\beta$ -Actin als Haushaltsgene verwendet. Um den  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert zu erhalten, wurden die  $\Delta\text{CT}$ -Werte nicht-stimulierter und stimulierter Zellproben zueinander ins Verhältnis gesetzt, woraus sich die relative Induktion des gesuchten Genproduktes unter verschiedenen Versuchsbedingungen ergab. Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Primer (siehe Tabelle 2) wurden von metabion international AG bezogen.

**Tabelle 2: Primer**

<b>VDR</b>	Sense: 5'-ATG GAG GCA ATG GCG GCC AGC AC-3' Antisense: 5'-TCA GGA GAT CTC ATT GCC AAA CAC-3'
<b>Cathelizidin (LL-37)</b>	Sense: 5'-TGG GCC TGG TGA TGC CT-3' Antisense: 5'-CGA AGG ACA GCT TCC TTG ATC G-3'
<b>CYP27B1</b>	Sense: 5'-ACC CGA CAC GGA GAC CTT-3' Antisense: 5'-ATG GTC ACC AGC GTG GAC AC-3'
<b>CYP24A1</b>	Sense: 5'-CGC AGC GGC TGG AGA T-3' Antisense: 5'-CCG TAG CCT TCT TTG CGG TA-3'
<b>18S-rRNA</b>	Sense: 5'-AGT CCC TGC CCT TTG TAC ACA-3' Antisense: 5'-GAT CCG AGG GCC TCA CTA AAC-3'
<b><math>\beta</math>-Actin (Maus)</b>	Sense: 5'-AGA TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA CC-3' Antisense: 5'-TCC ATA CCC AAG AAG GAA GGC TG-3'
<b>mCRAMP (Maus)</b>	Sense: 5'-GGA TGA GAA TAA ATG AGG CTC TC-3' Antisense: 5'-TTT AGG AAT CCA GAA ACA GGC-3'

**3.2.6.1 Gelelektrophorese**

Die Ergebnisse der PCR-Amplifikation wurden zur Qualitätskontrolle in einer Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 2 % Agarose-Gele in TBE-Lösung verwendet. Die Proben wurden mit Orange Loading Dye aufgetragen und bei 130 Volt aufgetrennt. Die Größe des amplifizierten Produktes wurde anhand des verwendeten Standards (FastRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use, 50–1500 bp) überprüft.

### 3.2.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Die ELISA-Methode ist ein immunologisches Verfahren, das den Nachweis verschiedenster Substanzen (z. B. Proteine, Hormone, Mikroorganismen usw.) in einer Probe ermöglicht. Das Grundprinzip eines ELISA beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Das Antigen wird durch einen spezifischen Antikörper gebunden, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Durch die enzymatische Umsetzung eines zugegebenen Substrates und die Messung des entstehenden Produktes kann die Menge an vorhandenem Antigen bestimmt werden. Die Methode wurde erstmal 1971 durch Engvall und Perlman beschrieben (Engvall and Perlmann 1971). Das simple aber elegante Grundprinzip des ELISAs hat seitdem viele Erweiterungen erfahren, so z. B. die Abwandlung in einen Double-Antibody-Sandwich-ELISA, der für diese Arbeit verwendet wurde. Bei diesem Verfahren werden zwei für das Antigen spezifische Antikörper eingesetzt sowie ein dritter sekundärer Antikörper. Der *Capture-Antibody* bindet an die feste Phase und gleichzeitig an das gesuchte Antigen. Der *Detection-Antibody* bindet ebenfalls an das Antigen, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Der sekundäre Antikörper bindet schließlich an den Fc-Anteil des *Detection-Antibody* und kann mit Biotin gelabelt werden. Streptavidin ist ein bakterielles Protein, das eine der stärksten bekannten molekularen Bindungen mit Biotin eingehen kann. Die Konjugation von Streptavidin mit Peroxidase (POD) ermöglicht die Reaktion mit einem zugegebenen Substrat. Der Vorteil dieses Vorgehens besteht in der universellen Verwendbarkeit und billigeren Herstellung der sekundären Antikörper im Gegensatz zu primären Antikörpern mit Enzym-Koppelung.

Die Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellüberständen wurde mittels ELISA-Kits nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurden ELISAs zur Bestimmung der IL-1 $\beta$ -, TNF- $\alpha$ - und IL-8-Konzentration verwendet.

Die Stimulation der Zellen erfolgte wie unter Kapitel 3.2.2 beschrieben. Anschließend wurden die Überstände entnommen und in 1 ml Eppendorfgefäße überführt. Der Zelldetritus wurde durch Zentrifugation (5 min, 13.000 U/min) von den Überständen getrennt, um die Zerstörung der Zytokine durch Proteasen zu minimieren.

96-Loch-Mikrotiterplatten wurden über 12 h bei 4 °C mit 100  $\mu$ l des jeweiligen *Capture-Antibody*s für IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 4  $\mu$ l/ml beschichtet. Anschließend wurden die Platten mit PBS gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 300  $\mu$ l Blocking-Reagens für 2 h bei



37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte die Befüllung mit 100 µl der Proben bzw. der Standardverdünnung mit Diluent und die Inkubation über 12 h bei 4 °C. Im nächsten Schritt wurden 100 µl des *Detection-Antibody* in einer Konzentration von 50 µg/ml aufgetragen und die Platten für 2 h bei Raumtemperatur gelagert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Danach folgte die Zugabe von 100 µl Streptavidin-POD-Konjugat (5 µl/30 ml) für 20 min bei Raumtemperatur. Durch die Zugabe von 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) als chromogenem Substrat erfolgte ein Farbumschlag nach blau, dessen Intensität sich proportional zur Menge des gesuchten Antigens verhält. Die Reaktion wurde nach 10 min durch eine Stopplösung (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 100 µl/Vertiefung) beendet. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Tecan Ultra 384 Reader gemessen. Alle Proben wurden im Doppelansatz gemessen. Zur Berechnung der Konzentration wurde der Leerwert abgezogen und die Konzentration anhand der mitgeführten Standarddeichkurve mit Hilfe der Magellan™-Data Analysis Software berechnet.

Alle verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 3) sowie die Standards stammen von R&D Systems.

**Tabelle 3: Verwendete Antikörper für ELISAs.**

(IgG: Immunglobulin-G; MAb: monoclonal antibody; PAb: peroxidase conjugated antibody)

Antikörper	Arbeitskonzentration
Human TNF- $\alpha$ MAb (Clone 28401), Mouse IgG1	4 $\mu$ g/ml
Human TNF- $\alpha$ Biotinylated Affinity Purified PAb, Goat IgG	200 ng/ml
Recombinant Human TNF- $\alpha$ Standard	2000 pg/ml bis 31,2 pg/ml
Human IL-1 $\beta$ /IL-1F2 MAb (Clone 2805), Mouse IgG1	Arbeitskonzentration 4 $\mu$ g/ml
Human IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Biotinylated Affinity Purified PAb, Goat IgG	100 ng/ml
Recombinant Human IL-1 $\beta$ /IL-1F2	500 pg/ml bis 7,8 pg/ml
Human CXCL8/IL-8 MAb (Clone 6217), Mouse IgG1	4 $\mu$ g/ml
Human CXCL8/IL-8 Biotinylated Affinity Purified PAb, Goat IgG	100 ng/ml
Recombinant Human CXCL8/IL-8	500 pg/ml bis 7,8 pg/ml

### 3.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Um zu testen, ob die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit Vitamin D auf Proteinebene zu einer erhöhten Ausschüttung von LL-37 nach Stimulation mit LPS führt, wurde der LL-37-Gehalt der Zellüberstände mittels SDS-Page und Western-Blot-Analyse gemessen.

Die SDS-PAGE, ein 1970 erstmals von Laemmli beschriebenes Verfahren, ist eine Sonderform der Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Durch die Verwendung von SDS, einem anionisch geladenen Detergenz, ermöglicht sie die analytische Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld nach ihrer Masse, unabhängig von ihrer Eigenladung. Durch die Kombination mit dem Western-Blot-Verfahren können die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden.

#### 3.2.8.1 Proteinkonzentrationsmessung

Nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten wurden die Überstände abgenommen und zentrifugiert (5 min, 6.000 U/min), um mögliche Zellrückstände zu entfernen.

Über das BCA™ Protein Assay Kit wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt, um später eine gleichmäßige Beladung in der SDS-Page sicherzustellen. 25 µl jeder Probe bzw. eines Standards mit definierter Proteinkonzentration wurden mit BCA™ Protein Assay Reagents A und B im Verhältnis 50:1 versetzt und auf eine 96-Well-Mikropipettierplatte aufgetragen. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte die Konzentrationsbestimmung über Extinktionmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Tecan Ultra 384 Reader. Alle Proben wurden im Doppelansatz gemessen. Anhand der Proteinkonzentration der einzelnen Proben errechnete sich die jeweils einzusetzende Probenmenge, die anschließend mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt wurde.

#### 3.2.8.2 SDS-PAGE

Die auf ihren Proteingehalt normalisierten Proben wurden in Eppendorfgefäßen mit 5 µl Roti-Load™ loading buffer gemischt und zur Denaturierung der Proteine für 1 min auf 95 °C im Thermobloc erwärmt. Der zugefügte loading buffer enthält denaturierende Agenzien (u. a. SDS), die Disulfidbrücken und höhere Bindungen der Sekundärstruktur aufbrechen, außerdem Farbstoff und Glycerin als Beschwerungsmittel. Durch ein Phosphat-Puffersystem wird zusätzlich der pH-Wert der Probe konstant gehalten. Nach der Denaturierung folgte eine Zentrifugation (2 min, 8.000 U/min), um eine Durchmischung der Suspension zu gewährleisten und Kondensationen am Gefäßdeckel zu beseitigen. Für die SDS-PAGE wurden 12 %ige Tris-Tricin-Gele mit den Proben beladen sowie eine Positivkontrolle und ein

Standardmarker mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 120 Volt für 90 min im Laufpuffer.

### 3.2.8.3 Western-Blot

Um die aufgetrennten Proteinbanden für die Detektion durch Antikörper zugänglich zu machen, wurde das Western-Blot-Verfahren in Abwandlung der von Towbin et al. 1979 beschriebenen Verfahrensweise angewandt (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979).

Die Übertragung der Proteinbanden der SDS-PAGE erfolgte entlang eines elektrischen Feldes senkrecht zur Fließrichtung des Gels auf eine Nitrocellulose-Membran 0,45 µm. Das verwendete Tank-Blot-System wurde mit der Gelkassette beladen und mit Transferpuffer befüllt. Der Übertragungsvorgang lief bei 20 Watt über 70 min.

### 3.2.8.4 Färbung und Inkubation mit Antikörpern

Nach Beendigung des Blotting-Vorganges wurde die Nitrocellulose-Membran für 2 h mit einer 10 %igen Milchpulverlösung inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Dann wurde die Membran für 12 h über Nacht bei 4 °C mit Anti-human-LL37-Antikörper (Kaninchen) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS jeweils für 15 min, um überschüssige Antikörperanteile zu entfernen, bevor die zweite Inkubation mit einem Anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat für 2 h bei Raumtemperatur erfolgte. Danach schloss sich ein erneuter Waschschrift an.

Die Bestimmung der POD-Aktivität erfolgte unter Verwendung des ECL-Systems. Durch Oxidation von Luminol kommt es zur Emission von Licht (Chemolumineszenz), das autoradiographisch detektiert werden kann. Dazu wurde die Nitrocellulose-Membran 1 min mit Chemolumineszenz-Lösung inkubiert, in Plastikfolie eingeschlagen und in eine Filmkassette mit Röntgenfilm eingelegt. Die Expositionsdauer des Röntgenfilmes betrug in der Regel 10 min. Anschließend wurde der Röntgenfilm in Entwickler- und Fixierlösung gebadet und so der Belichtungsprozess beendet. Die Größe der detektierten Proteine der jeweiligen Proteinbanden konnte anhand des mitgeführten Markers abgeleitet werden. Die Dichte der Schwärzung der Proteinbanden ist ein semiquantitatives Maß der Proteinexpression und wurde über densitometrische Auswertung und Umrechnung in Integrale über die Software ImageJ-Image Processing and Analysis in Java bestimmt.

Die für die Western-Blots verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 gelistet.

**Tabelle 4: Antikörper für Western-Blots**

Antikörper	Herkunft
LL-37 (H-40); Kaninchen polyklonal IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kaninchen-HRP; Esel IgG	Amersham

### 3.2.9 Eliminationsassay

Um den Einfluss von Vitamin D auf die bakterielle Clearance von Makrophagen zu untersuchen, wurde ein Eliminationsassay in Anlehnung an die 1979 von Leijh erstmals beschriebene Methode durchgeführt (Leijh et al. 1979). Durch die Inkubation von stimulierten bzw. nicht-stimulierten Makrophagen mit lebenden Bakterienstämmen können Unterschiede in der antimikrobiellen Aktivität bestimmt werden.

#### 3.2.9.1 Bakterienkultur

Für den Eliminationsassay wurden *P. aeruginosa* PAO1 NH57388A (Dr. Niels Hoiby, Universität Kopenhagen, Dänemark) und *Staphylococcus aureus* 113 wt (Wildtyp) sowie eine LL-37-resistente Mutante (*Staphylococcus aureus* 113 bearing pRBdl1) (Dr. A. Peschel, Universität Tübingen, Deutschland) verwendet. Bei *P. aeruginosa* PAO1 NH57388A handelt es sich um einen Stamm mit mukoidem Wachstum und der Fähigkeit zur AHL-Synthese (N-Acyl-Homoserinlaktone). Er wurde erstmals aus dem Sputum eines Patienten mit zystischer Fibrose isoliert. Um die Stämme zu konservieren, wurde 1 ml einer Flüssigkultur mit 2 ml Glycerin versetzt und bei -80 °C in Eppendorfgefäßen gelagert. Für die Versuche wurden jeweils 50 ml Nährbouillon mit einer ausgeglühten Öse aus den konservierten Beständen inokuliert. Die Bakterienanzucht erfolgte über Nacht in Flüssigmedium bei 37 °C unter Schütteln (*Staphylococcus aureus*) bzw. ohne Schütteln (*P. aeruginosa* PAO1). Am nächsten Tag wurden 10 µl der Bakteriensuspension auf einer Agarplatte ausgestrichen und diese bei 37 °C inkubiert. Am Versuchstag wurden die Kolonien geerntet und in PBS suspendiert. Zur Bestimmung der Konzentration der Bakteriensuspension wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer bestimmt und mit einer Standardsuspension verglichen. *P. aeruginosa* PAO1 und *Staphylococcus*

*aerius* wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 (ca.  $3 \times 10^8$  cfu (*colony forming units*)/ml) abzentrifugiert, gewaschen und im Ausgangsvolumen mit PBS resuspendiert.

### 3.2.9.2 Durchführung des Eliminationsassays

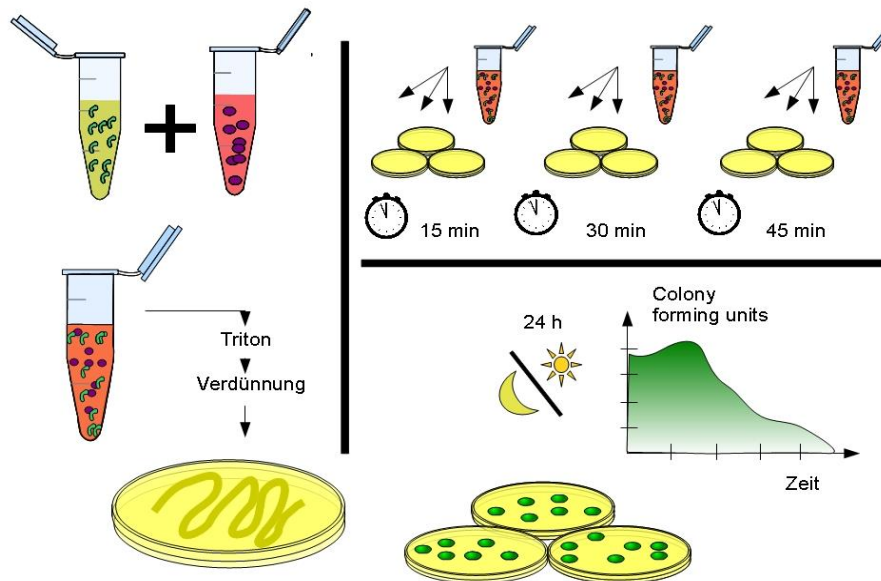
Makrophagen wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben isoliert und ausdifferenziert. 24 h vor Beginn des Versuchs wurden die Zellen abzentrifugiert und mit Serum- und Penicillin/Streptomycin-freiem Medium unter Zusatz von 1 % BSA resuspendiert. Die Zugabe von BSA sollte die Reaggregation an die Kulturschale sowie die Zell-Zell-Aggregation vermindern und eine möglichst homogene Bakterien-Makrophagen-Durchmischung während des Versuches gewährleisten. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $10^6$  Zellen/ml auf zwei Kulturschalen verteilt und 2 h mit 10 nM Pam3CSK4 stimuliert. Eine Kulturschale wurde mit 25VitD3 für 24 h inkubiert. Mit einer Trypanblau-Färbung wurde vor Beginn des Versuches die Zellzahl und Viabilität untersucht, um die gleiche Anzahl vitaler Zellen in allen Versuchsgruppen sicherzustellen.

Die Bakterien wurden für 30 min bei 36 °C in humanem Serum inkubiert. Zur Deaktivierung des Komplementsystems wurde das humane Serum vorher für 30 min auf 56 °C erwärmt. Anschließend wurden die Bakterien zum Zeitpunkt 0 min mit der Zellsuspension gemischt ( $10^6$  Zellen/ml: $10^4$  cfu/ml *P. aeruginosa* PAO1, Volumen-Ratio 1:2 bzw.  $10^6$  Zellen/ml: $10^4$  cfu/ml *Staphylococcus aureus*, Volumen-Ratio 1:1). Da die Halbwertszeit der Phagozytose für verschiedene Bakterienstämme typischerweise unter 15 min liegt, wurden die weiteren Entnahmezeitpunkte der Proben entsprechend gewählt. Zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min) fand eine Entnahme von 20 µl der Suspension statt. Die Zugabe von 80 µl Triton 0,1 % führte zur Zerstörung der Zellen. Darauf folgte eine Verdünnung mit PBS. Der Verdünnungsfaktor wurde dabei in Abhängigkeit des Zeitpunktes gewählt (Zellen + Bakterien: 0 min und 15 min 1:100, alle späteren Zeitpunkte 1:10 bzw. reine Bakteriensuspension als Kontrolle: 0 min und 15 min 1:100, alle späteren Zeitpunkte 1:1000). Pro Probe wurden 20 µl der verdünnten Suspension auf je drei Agarplatten ausgestrichen.

Zwischen den Zeitpunkten wurden die Proben bei 37 °C unter Schütteln (200–300 U/min) inkubiert. Die Anzucht der beimpften Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C im Bakterien-Brutschrank. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien wurde als Überleben über die Zeit bestimmt. Als Kontrolle wurde eine reine

Bakteriensuspension mit einer äquivalenten Menge des zellfreien Überstandes (stimuliert mit Vitamin D und Pam3CSK4 bzw. stimuliert nur mit Pam3CSK4) verwendet. So konnte eine erhöhte bakterielle Clearance als Folge eines zytotoxischen Effektes von Vitamin D ausgeschlossen werden.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Eliminationsassays. Durchführung siehe Kap. 3.2.9.



### 3.2.10 Herstellung von Zigarettenrauch-Extrakt (*cigarette smoke extract, CSE*)

Für die Herstellung des CSE wurde Zigarettenrauch mit Hilfe einer Absaugpumpe durch DMEM-Medium gesprudelt. Es wurden handelsübliche Marlboro 100 Zigaretten (11 mg Teer, 0,9 mg Nikotin) verwendet. Die Filter der Zigaretten wurden bei dem Prozess belassen, da diese die Zusammensetzung des inhalierten Rauches verändern (z. B. durch die Absorption hochsiedender und kanzerogener Bestandteile). In einer speziellen Plexigaskammer wurden jeweils zwei Zigaretten mit dem Filter in eine Saugvorrichtung angebracht und für 5 min/Zigarette abgebrannt. Der abgesaugte Rauch wurde durch ein Falcon tube mit 20 ml DMEM geleitet.

Das gewonnene CSE wurde auf einen pH von 7,4 eingestellt, durch einen Membranfilter steril filtriert und direkt für die Versuche verwendet. Dabei wurde das gewonnene CSE als 100 % Stammlösung definiert.

### 3.2.11 Stimulation mit Zigarettenrauch-Extrakt

Um den Einfluss von Zigarettenrauch und Vitamin D auf die Entzündungsreaktion von Makrophagen zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Rauchextraktes behandelt. Es wurden 0,1 % und 0,5 % der Stammlösung verwendet. Die Stimulation mit Vitamin D (Konzentration  $10^{-7}$  M) erfolgte für 12 h. Für die Versuche ohne Vitamin D wurden die Zellen für den gleichen Zeitraum mit dem äquivalenten Volumen des Lösungsmittels (70 % Ethanol) inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit CSE alleine oder in Kombination mit LPS (100 ng/ml für 4 h). Mittels qRT-PCR wurde die hCAP-18-mRNA-Expression gemessen, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wurde über ELISA bestimmt.

### 3.2.12 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte über eine Varianzanalyse durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Durch diesen Test können zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen werden. Der Kruskal-Wallis-Test wurde eingesetzt, wenn drei oder mehr unabhängige Stichproben miteinander verglichen werden sollten. In beiden Fällen handelt es sich um Rangsummentestverfahren, sie sind parameterfrei (keine Annahme einer Gaußschen Normalverteilung) und auf ordinalskalierte Variablen anwendbar. Bei einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen und Unterschiede in den Ergebnissen als statistisch signifikant gewertet. Für die graphische Auswertung der Ergebnisse wurde die Darstellung als Boxplot gewählt. Die namensgebende Box entspricht dabei dem Bereich in dem 50 % der Daten liegen und wird durch das obere und untere Quartil begrenzt. Die mittlere Linie zeigt den Medianwert an. Der größte und kleinste Wert der Datenmenge wird jeweils durch die sogenannten *whisker* (engl. für Fühler) an der Box dargestellt. Der Boxplot eignet sich besonders für die Zusammenfassung von Daten, bei denen nicht grundsätzlich von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann. Zur Bearbeitung der Daten sowie zur Erstellung aller Tabellen wurde mit dem Computerprogramm Microsoft Excel XP gearbeitet. Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 5.2 verwendet. Zur Auswertung der ELISAs wurde das Computerprogramm Magellan™-Data Analysis Software verwendet, zur Auswertung der Western-Blots die Open Source Software ImageJ-Image Processing and Analysis in Java.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Stimulationsexperimente mit Vitamin D

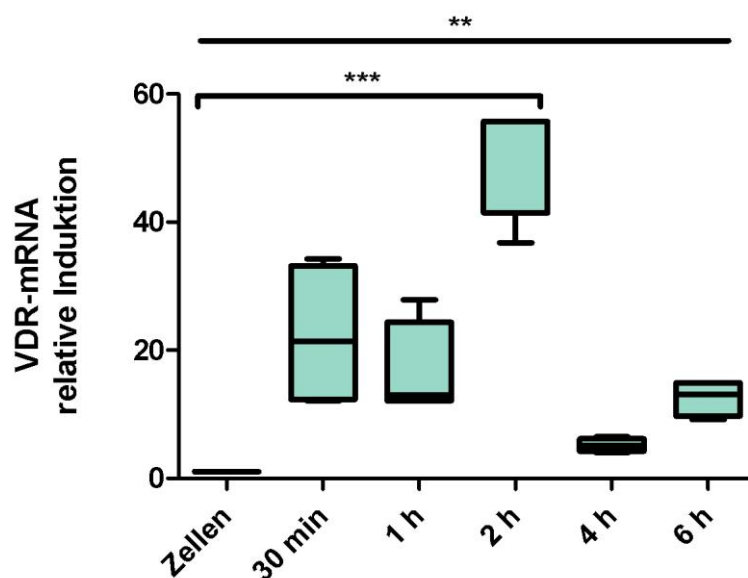
#### 4.1.1 Stimulation von humanen Makrophagen

##### 4.1.1.1 TLR1/2-Liganden führen zu einer erhöhten Expression des Vitamin-D-Rezeptors

Humane Makrophagen wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben mit dem TLR1/2-Liganden Pam3CSK4 stimuliert. Proben wurden nach 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h genommen. Mittels qRT-PCR wurde die VDR-mRNA-Expression ermittelt.

Die Stimulation mit Pam3CSK4 führte zu einer signifikanten Induktion von VDR-mRNA bereits nach 30 min. Die stärkste Induktion konnte nach einer Inkubationszeit von 2 h detektiert werden. Längere Inkubationen von 4 h oder 6 h führten zu keiner weiteren Steigerung der VDR-mRNA-Expression. Abbildung 4 zeigt die VDR-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Zeit. Die Unterschiede zu den nicht stimulierten Zellen sind mit  $p < 0,001$  (Werte für 30 min, 1 h, 2 h) und  $p < 0,001$  (4 h, 6 h) hochsignifikant.

Abbildung 4: Expression von VDR-mRNA bei humanen Makrophagen nach Stimulation mit einem TLR1/2-Liganden. Die Zellen wurden für 30 min, 1 h, 2 h, 4 h oder 6 h mit Pam3CSK4 inkubiert. Die Normalisierung der VDR-mRNA-Expression erfolgte auf die 18S-rRNA-Expression. Zellen: keine Stimulation;  $p < 0,001$  \*\*\*;  $p < 0,01$  \*\*



#### 4.1.1.2 Vitamin D induziert eine erhöhte Expression von hCAP-18-mRNA bei humanen Makrophagen

Humane Makrophagen wurden mit verschiedenen Vitamin-D-Konzentrationen (25- und 1,25VitD3) stimuliert sowie zusätzlich mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 oder LPS. Die Versuche wurden in Serum-freiem Medium durchgeführt, da FCS Vitamin D in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten kann.

Die Stimulation mit Vitamin D führte bei humanen Makrophagen zu einer erhöhten Expression von hCAP-18-mRNA. Die Höhe der Expression war dabei abhängig von der eingesetzten Vitamin-D-Konzentration und zeigte ein Maximum bei 80 nmol/l (ca. 30 ng/ml). Höhere Konzentrationen von 130 nmol/l (ca. 50 ng/ml) führten zu einer Abnahme der Expression. Für Konzentrationen um 25 nmol/l (ca. 10 ng/ml) konnte keine signifikante Induktion der hCAP-18-mRNA gezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit 25VitD3 und mit der aktiven Form 1,25VitD3 konnte nicht festgestellt werden. Die Stimulation mit dem TLR1/2-Liganden Pam3CSK4 alleine zeigte keinen Einfluss auf die Regulation der AMP-mRNA. Wurden humane Makrophagen nur mit *P. aeruginosa* PAO1 oder LPS stimuliert, zeigte sich ebenfalls keine Induktion der hCAP-18-mRNA. Erst die gemeinsame Inkubation mit Vitamin D und *P. aeruginosa* PAO1 bzw. LPS führte zu einer signifikanten Erhöhung der hCAP-18-mRNA. Abbildung 5 zeigt die hCAP-18-mRNA Induktion durch Vitamin-D-Stimulation in verschiedenen Konzentrationen. Abbildung 6 zeigt die Stimulationsversuche mit *P. aeruginosa* PAO1 und Abbildung 7 mit LPS.

Abbildung 5: Expression von hCAP-18-mRNA durch Makrophagen bei verschiedenen Vitamin-D-Konzentrationen, gemessen durch qRT-PCR. Nach Stimulation mit einem TLR 1/2-Liganden erfolgte die weitere Inkubation mit Vitamin D in verschiedenen Konzentrationen für 24 h. TLR1/2: Zellen mit Pam3CSK4 stimuliert;  $p < 0,01$  \*\*

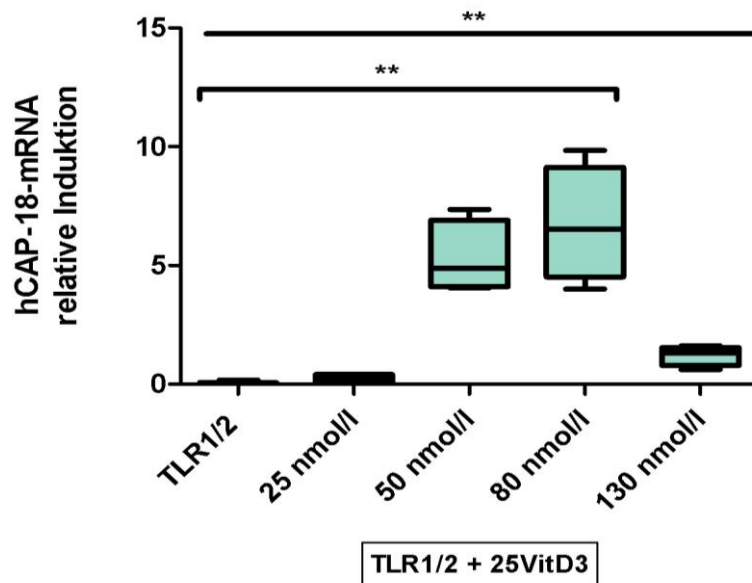


Abbildung 6: hCAP-18-mRNA-Expression in der qRT-PCR bei humanen Makrophagen nach Stimulation mit Vitamin D ohne oder mit *P. aeruginosa* PAO1 für 4 h. Zellen: Inkubation mit Pam3CSK4; PAO1: hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa*;  $p < 0,05$  \*

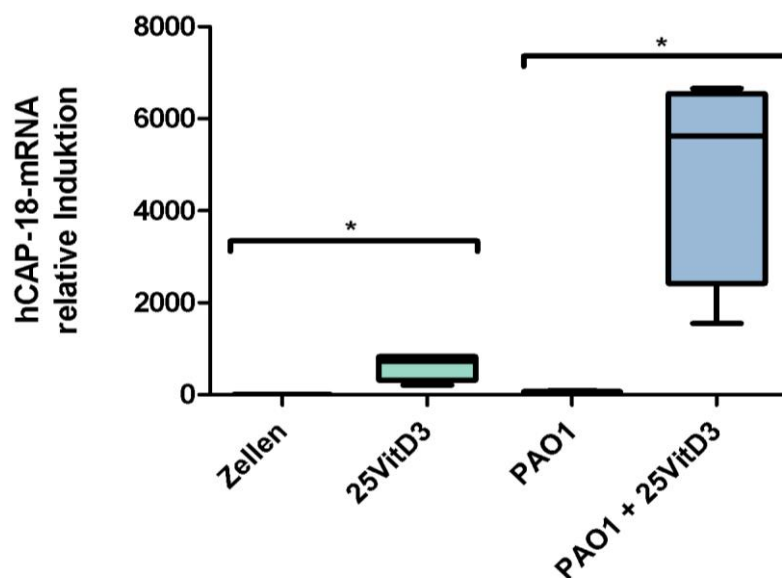
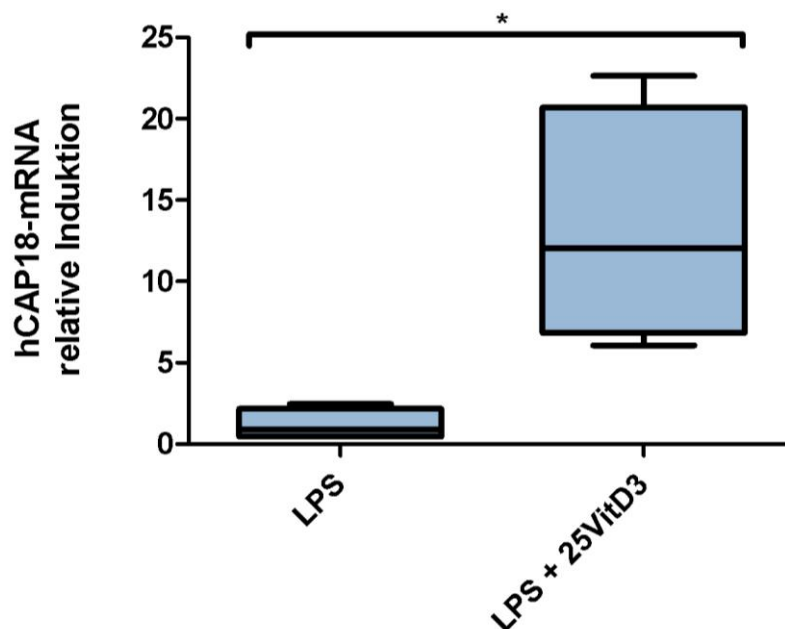


Abbildung 7: hCAP-18-mRNA-Expression bei humanen Makrophagen nach Stimulation mit LPS für 4 h (qRT-PCR). Zellen: Inkubation mit Pam3CSK4; PAO1: Stimulation mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa*;  $p < 0,05$  \*;  $p < 0,01$  \*\*



#### 4.1.1.3 Vitamin D vermindert die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine bei humanen Makrophagen

Die Stimulation mit Vitamin D führte zu einer verminderten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bei humanen Makrophagen. Dabei konnte für verschiedene Vitamin-D-Konzentrationen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der Senkung der gemessenen IL-1 $\beta$ -Level nachgewiesen werden. Die Sekretion von IL-8 wurde durch die Stimulation mit Vitamin D nicht signifikant beeinflusst.

Die Inkubation von Makrophagen mit *P. aeruginosa* PAO1 oder LPS zeigte stark erhöhte TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im ELISA. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit *P. aeruginosa* PAO1/LPS und Vitamin D zeigten sich dagegen in beiden Fällen signifikant niedrigere Konzentrationen beider proinflammatorischer Zytokine in den Zellüberständen. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit 25VitD3 oder 1,25VitD3 gefunden.

Abbildung 8 zeigt unter (A) die Konzentration von IL-1 $\beta$  bei Makrophagen, die mit Pam3CSK4 und Vitamin D, *P. aeruginosa* PAO1 bzw. mit *P. aeruginosa* PAO1 und Vitamin D stimuliert wurden und unter (B) die Senkung der IL-1 $\beta$ -Konzentration in

Abhängigkeit von der eingesetzten Vitamin-D-Konzentration. Abbildung 9 zeigt die Konzentration von TNF- $\alpha$  nach Inkubation mit Vitamin D, *P. aeruginosa* PAO1 bzw. nach Stimulation mit beiden Komponenten. In Abbildung 10 sind die gemessenen IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nach Inkubation mit Pam3CSK4, Vitamin D und LPS abgebildet. Abbildung 11 zeigt die IL-8-Sekretion nach Stimulation mit Pam3CSK4 und Vitamin D.

Abbildung 8: Messung der IL-1 $\beta$ -Konzentration mittels ELISA nach Vitamin-D-Stimulation.

(A) Humane Makrophagen wurden mit Pam3CSK4 und Vitamin D, *P. aeruginosa* PAO1 bzw. mit beiden stimuliert. Gemessen wurde die IL-1 $\beta$ -Konzentration in den Zellüberständen nach 4 h.

(B) Die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellüberstand nach Stimulation durch Pam3CSK4 und verschiedenen Konzentrationen Vitamin D. Zellen: Pam3CSK4-Stimulation; PAO1: hitzeinaktivierten *Pseudomonas aeruginosa*;  $p < 0,05$

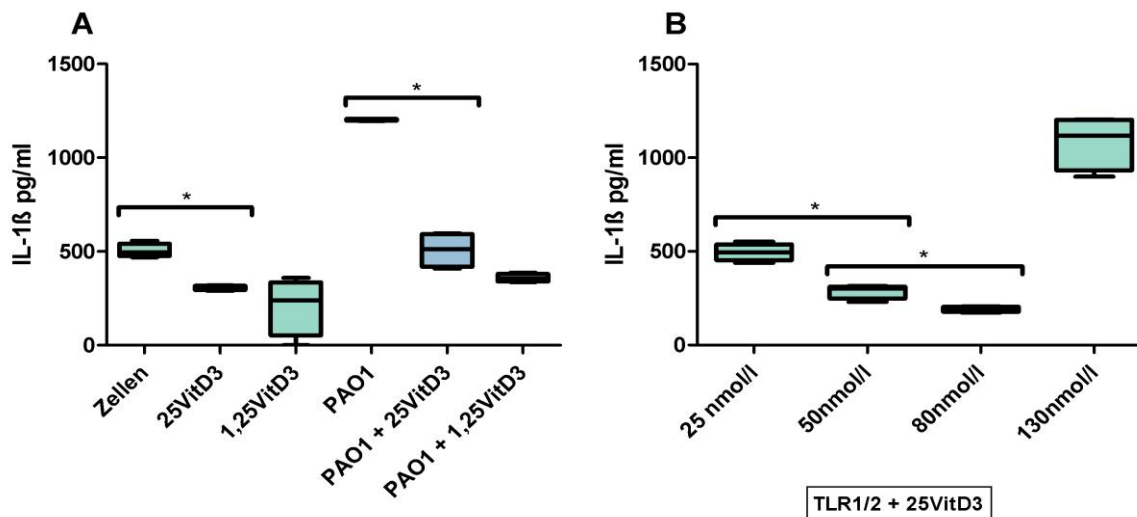


Abbildung 9: Messung von TNF- $\alpha$  in Zellüberständen humaner Makrophagen nach Inkubation mit Vitamin D und PAO1. Nach 4 h wurde die Abgabe von TNF- $\alpha$  im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Zellen: mit Pam3CSK4; PAO1: hitzeinaktivierte *Pseudomonas aeruginosa*;  $p < 0.05$  \*

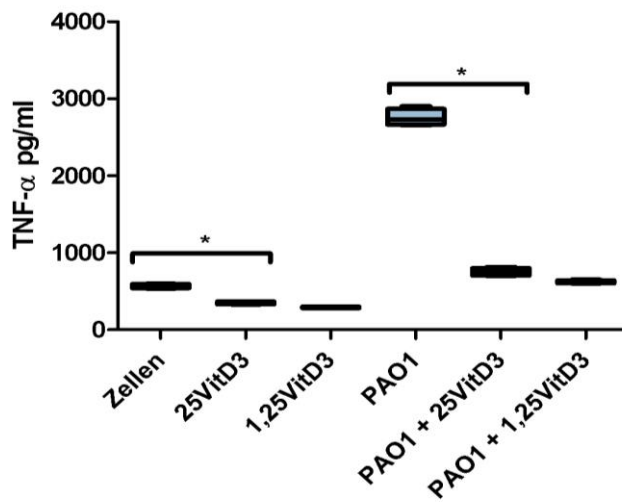


Abbildung 10: Messung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in Zellüberständen humaner Makrophagen nach Stimulation mit LPS und Vitamin D. LPS = Stimulation mit Lipopolysaccharid;  $p < 0.05$  \*

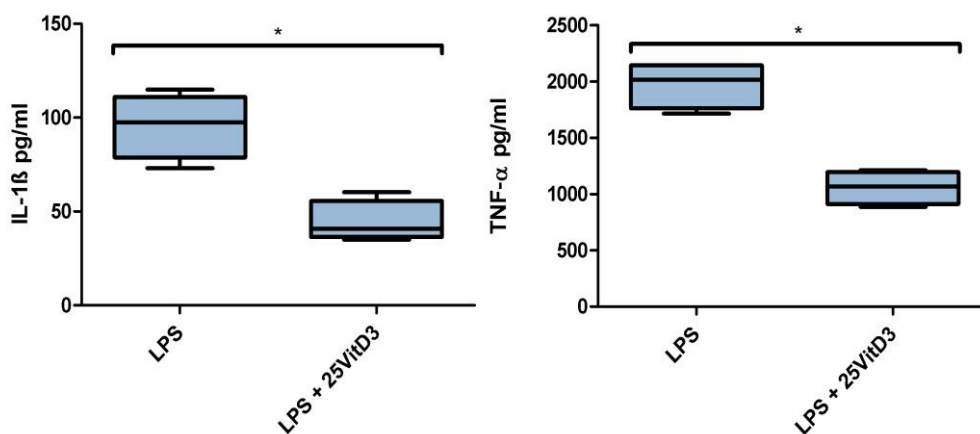
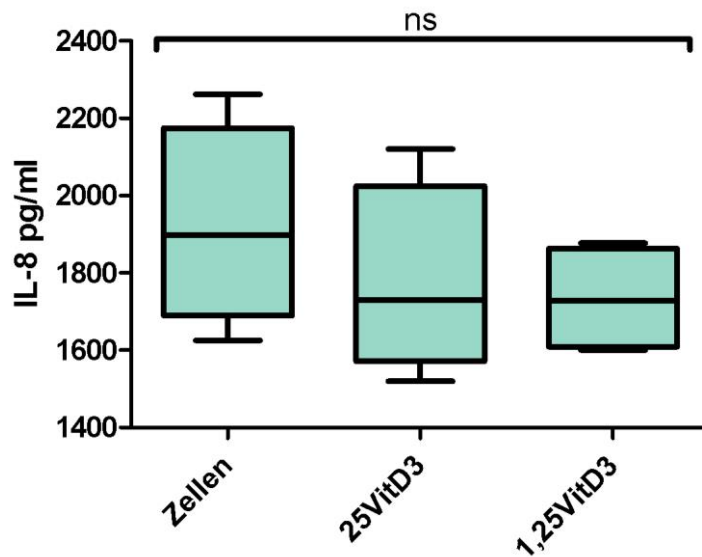


Abbildung 11: IL-8-Sekretion humaner Makrophagen nach der Stimulation mit Pam3CSK4 und Vitamin D gemessen mittels ELISA. Zellen: Pam3CSK4-Stimulation; ns: nicht signifikant

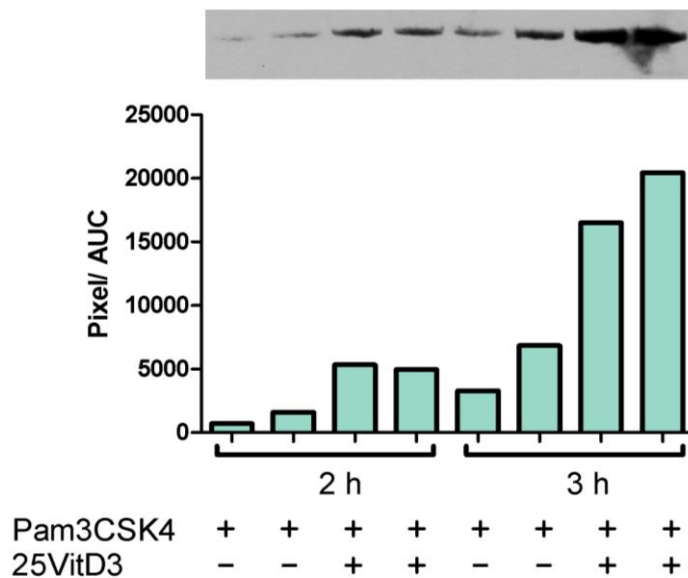


#### 4.1.2 Stimulation neutrophiler Granulozyten

##### 4.1.2.1 Vitamin D steigert LL-37 Sekretion

Humane neutrophile Granulozyten wurden mit Pam3CSK4 und Vitamin D stimuliert. Entsprechend dem Vorgehen bei humanen Makrophagen erfolgte die Inkubation mit Vitamin D für 24 h. Da bei dieser Inkubationszeit kein signifikanter Effekt nachweisbar war, wurde die Inkubationszeit mit Blick auf die kurze Lebensspanne von aktivierten neutrophilen Granulozyten im Gewebe auf 2 h bzw. 3 h verkürzt. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse konnte daraufhin eine erhöhte Konzentration von LL-37 im Zellüberstand nach Vitamin-D-Stimulation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). Eine signifikante Erhöhung der hCAP-18-mRNA-Expression mittels qRT-PCR wurde zu keinem Zeitpunkt gemessen (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 12: Ausschüttung von LL-37 durch neutrophile Granulozyten. Die Zellen wurden für 2 h bzw. 3 h mit Pam3CSK4 alleine oder in Kombination mit 25VitD3 stimuliert. Die Auswertung als Graph erfolgte mittels der ImageJ Processing and Analysis Software und gibt die relative Farbdichte der einzelnen Banden in Pixel/AUC an.

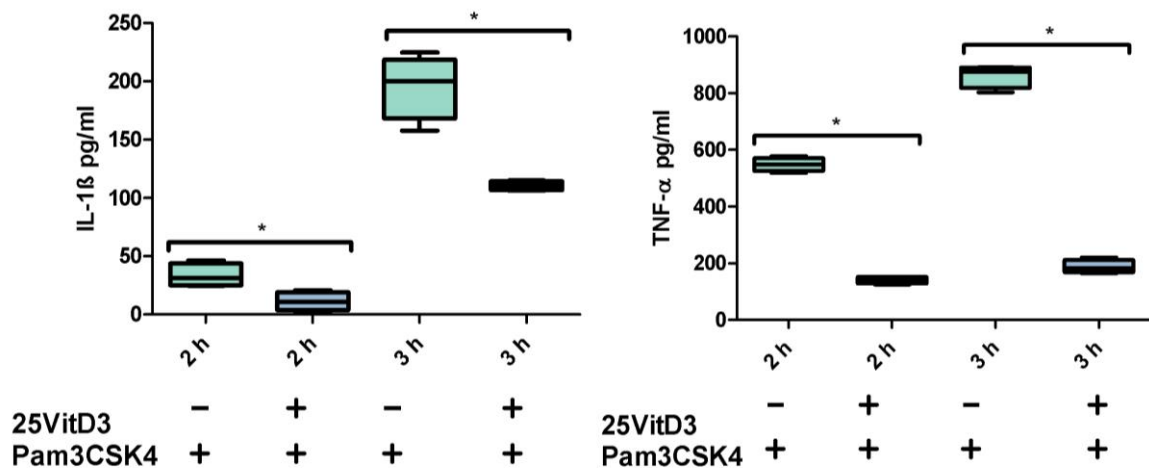


#### 4.1.2.2 Vitamin D vermindert die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine

Die Sekretion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  durch neutrophile Granulozyten wurde im ELISA gemessen. Die Stimulation der Zellen nach Aktivierung durch Pam3CSK4 und der Stimulation mit Vitamin D für 2 h bzw. 3 h führt zu einer verminderten Ausschüttung der Entzündungsmediatoren (siehe Abbildung 13).



Abbildung 13: IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ -Produktion von neutrophilen Granulozyten nach Vitamin D Stimulation. Aus dem Blut isolierte neutrophile Granulozyten wurden mit Vitamin D und Pam3CSK4 für 2 h oder 3 h stimuliert. Die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen.  $p < 0,05$  \*



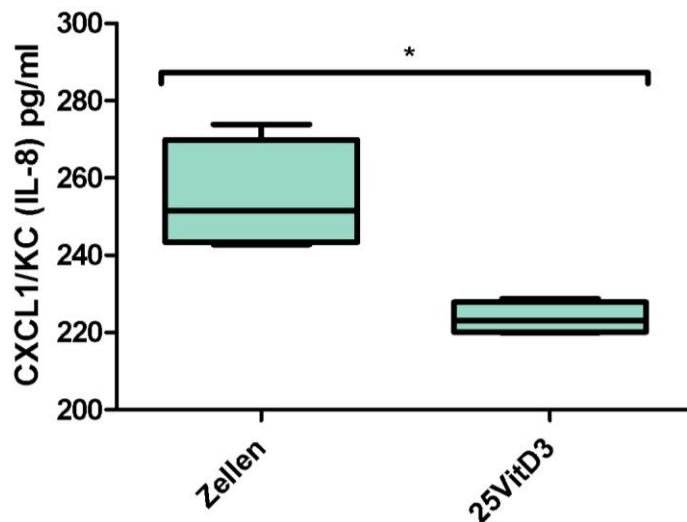
#### 4.1.2.3 Vitamin D zeigt keinen Einfluss auf die mCRAMP-mRNA-Expression

Murine Makrophagen wurden wie in Kapitel 3.2.1 isoliert und mit Pam3CSK4 sowie mit Vitamin D stimuliert. Durch die Stimulation mit Vitamin D in verschiedenen Konzentrationen konnte keine signifikante Induktion der mCRAMP-mRNA-Synthese nachgewiesen werden. Auch die Verwendung von 1,25VitD3 anstelle von 25VitD3 führte nicht zu Unterschieden in der gemessenen Expression (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2.4 Vitamin D vermindert die Ausschüttung von CXCL1/KC

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei humanen Makrophagen beeinflusste die Stimulation mit Vitamin D bei murinen Makrophagen nicht die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Im Gegensatz zu humanen Makrophagen, bei denen es nicht zu Veränderungen der IL-8-Konzentration nach Stimulation mit Vitamin D kam, führte die Stimulation von Mausmakrophagen mit Vitamin D zu einer signifikanten Hemmung der CXCL1/KC-Ausschüttung nach Aktivierung durch Pam3CSK4. Die CXCL1/KC-Konzentration nach Stimulation ist in Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 14: CXCL1/KC-Sekretion muriner Makrophagen nach Stimulation mit Vitamin D. Gemessen wurde die CXCL1/KC-Konzentration im Zellüberstand mit ELISA. Murine Peritonealmakrophagen wurden mit Pam3CSK4 und Vitamin D bzw. ohne Vitamin D für 24 h inkubiert. Zellen: Pam3CSK4-Stimulation;  $p < 0,05$  \*

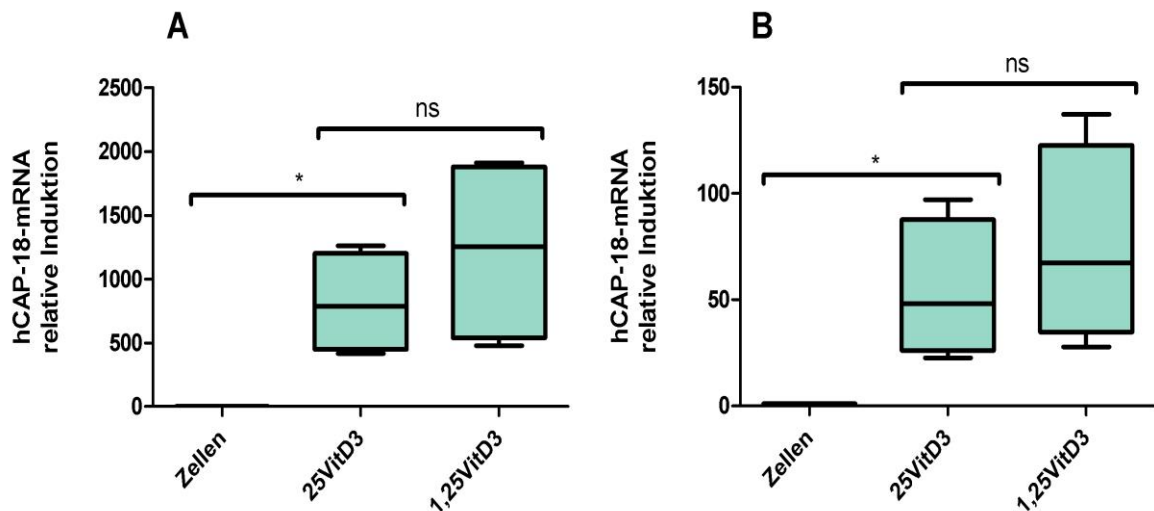


#### 4.1.3 Die Zelllinien U937 und MonoMac6

##### 4.1.3.1 Vitamin D induziert eine erhöhte Expression von hCAP-18-mRNA

Sowohl bei U937- als auch bei MonoMac6-Zellen führte die Inkubation mit dem TLR1/2-Liganden Pam3CSK4 und Vitamin D zu einer signifikant gesteigerten Expression von hCAP-18-mRNA im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem TLR1/2-Liganden behandelt wurden. Es konnte kein Unterschied in der Induktion der Genexpression zwischen den verschiedenen Vitamin D-Formen (25VitD3 oder 1,25VitD3) festgestellt werden. Abbildung 15 zeigt die relative Induktion von hCAP-18-mRNA nach Stimulation für beide Zelllinien.

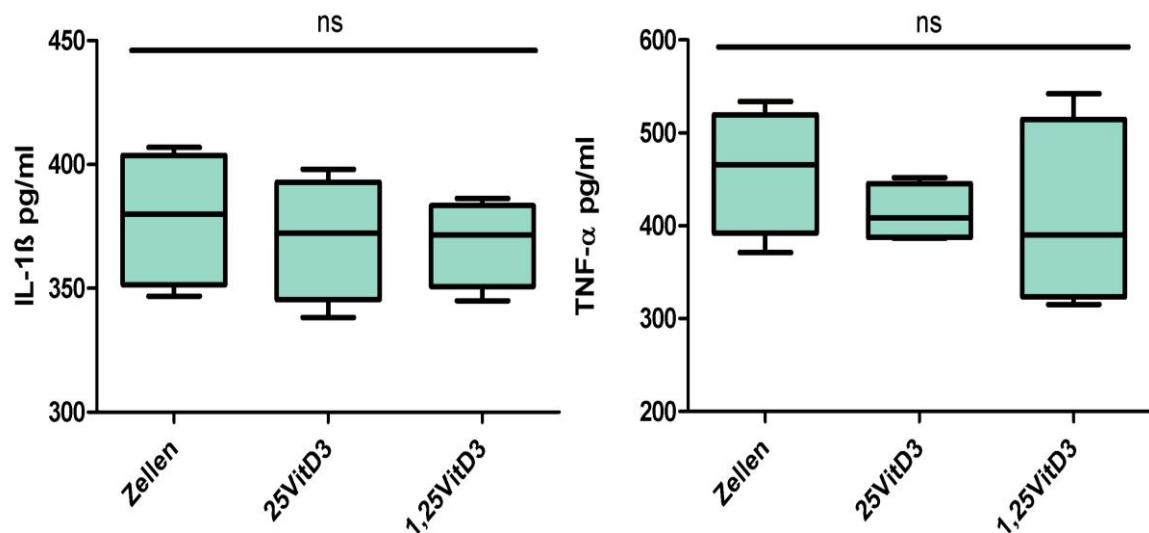
Abbildung 15: Expression von hCAP-18 in humanen Zelllinien nach Stimulation mit Vitamin D. (A) U937 oder (B) MonoMac6 wurden mit Pam3CSK4 und Vitamin D für 24 h inkubiert. Gezeigt ist die Induktion der hCAP-18-mRNA bestimmt mit qRT-PCR.  $p < 0,05$  \*; ns=nicht signifikant



#### 4.1.3.2 Vitamin D zeigt keinen Einfluss auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine

Entsprechend dem Vorgehen bei humanen Makrophagen wurde die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine von aktivierten U937- bzw. MonoMac6-Zellen mittels ELISA untersucht. Bei keiner der Zelllinien konnte durch Stimulation mit Vitamin D eine Reduktion der Ausschüttung von IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  erreicht werden. Die Verwendung von 25VitD3 oder der aktivierten Form 1,25VitD3 zeigte keine Unterschiede. Auch bei Aktivierung durch *P. aeruginosa* PAO1 zeigte die Stimulation mit Vitamin D keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion beider Zelllinien. Exemplarisch werden hier die Ergebnisse für die Zelllinie U937 in Abbildung 16 für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  dargestellt.

Abbildung 16: Messung proinflammatorischer Zytokine im Überstand nach Stimulation der Zelllinie U937 mit Vitamin D. Gemessen wurden die Konzentration von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  nach Inkubation mit Pam3CSK4 und 25VitD3 bzw. 1,25VitD3. Zellen = Pam3CSK4-Stimulation; ns = nicht signifikant



## 4.2 Eliminationsassay

### 4.2.1 Vitamin D steigert die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen

Die humanen Makrophagen wurden ohne Stimulus oder nach Stimulation mit Vitamin D mit den lebenden Bakterien inkubiert. Mit Vitamin D stimulierte humane Makrophagen zeigten eine signifikant höhere Eliminationsrate gegenüber lebenden *P. aeruginosa* PAO1 NH57388A. Dieser Effekt konnte über den gesamten Messzeitraum nachgewiesen werden. Ebenso zeigten mit Vitamin D stimulierte Makrophagen eine gesteigerte bakterielle Eliminationsrate gegenüber lebenden *Staphylococcus aureus* 113 wt (siehe Abbildung 17 und 18 (A)).

### 4.2.2 Bei LL-37-resistenten Bakterienstämmen zeigt Vitamin D keine Steigerung der antimikrobiellen Aktivität

Im Folgenden wurden Eliminationsassays unter der Verwendung eines LL-37-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stammes durchgeführt. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen bei den Versuchen mit Wt-Stämmen von *Staphylococcus aureus*. Bei der Auswertung des Versuches zeigte sich eine signifikant verminderte bakterielle Eliminationsrate der mit Vitamin D stimulierten Zellen gegenüber den LL-37-resistenten Stämmen im Vergleich zu den unbehandelten Makrophagen (siehe Abbildung 18 B).

Bei allen Eliminationsassays zeigten die als Kontrollen mitgeführten reinen Bakterienkulturen ein exponentielles Wachstum (nicht dargestellt). Dabei war kein Unterschied zwischen der Makrophagen-freien Suspension mit Vitamin D bzw. ohne Vitamin D feststellbar, so dass ein direkt hemmender Effekt des Wirkstoffs auf das Bakterienwachstum ausgeschlossen wurde.

Abbildung 17: Eliminationsassay mit humanen Makrophagen und *P. aeruginosa* PAO1.

(A) Dargestellt ist das Überleben der *P. aeruginosa* PAO1 über die Zeit, angegeben in Prozent. Zu den gewählten Zeitpunkten wurden jeweils drei Proben entnommen und auf Agarplatten ausgestrichen.

(B) Ausschnitt aus dem Zeitverlauf für die Zeitpunkte 30 min und 45 min. Ein Symbol entspricht einer beimpften Agarplatte. ● = Makrophagen + PAO1; ▲ = Vitamin-D-stimulierte Makrophagen + PAO1;  $p < 0.001$  \*\*\*

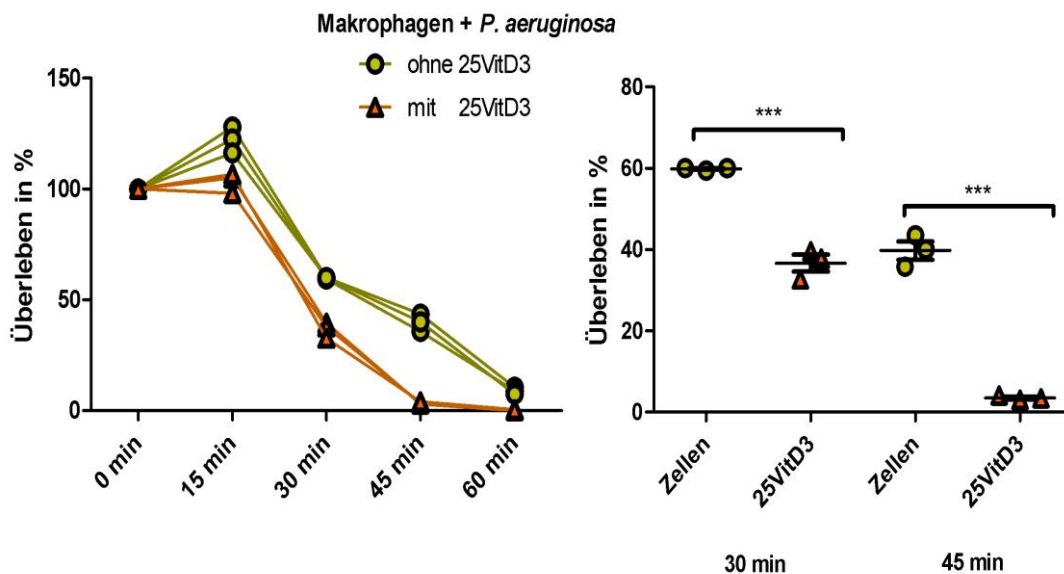
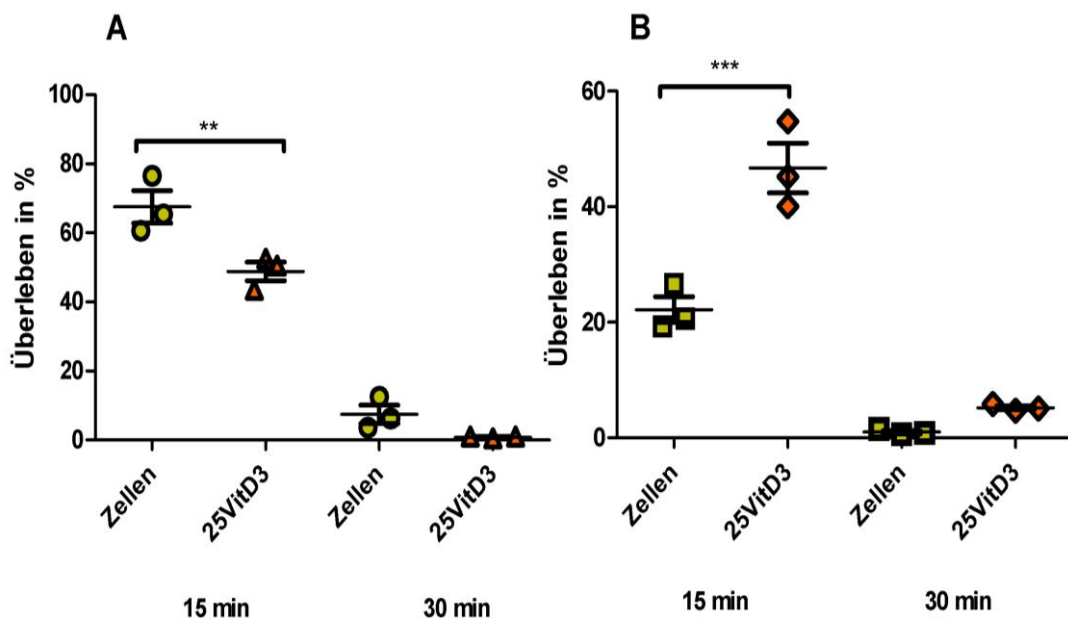


Abbildung 18: Eliminationsassay mit humanen Makrophagen und *Staphylococcus aureus*. Darstellung von zwei Eliminations-Assays. Bei beiden wurden die Zeitpunkte 15 min und 30 min gewählt. Insgesamt wurde jeder Assay dreimal durchgeführt.

(A) Eliminationsassay mit *Staphylococcus aureus* (wt).

(B) Eliminationsassay mit einem LL-37-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stamm. Ein Symbol entspricht einer beimpften Agarplatte. ● = Makrophagen + *Staphylococcus aureus*; ▲ = Vitamin-D-stimulierte Makrophagen + *Staphylococcus aureus*; ■ = Makrophagen + LL-37-resistente *Staphylococcus aureus*; ◆ = Vitamin-D-stimulierte Makrophagen + LL-37-resistente *Staphylococcus aureus*;  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*

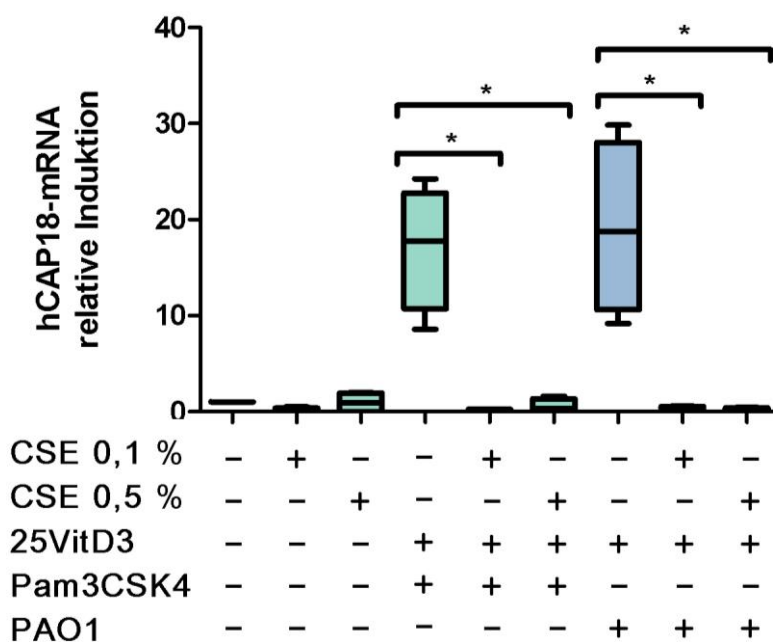


### 4.3 Stimulation mit Zigarettenrauch-Extrakt

#### 4.3.1 Unter CSE-Stimulation kommt es nicht zur Induktion von hCAP-18-mRNA durch Vitamin D

Humane Makrophagen wurden mit Pam3CSK4 behandelt, um eine Induktion des VDR-Rezeptors zu erreichen. Wie in Abbildung 19 gezeigt, führte die alleinige Behandlung der Zellen mit 0,1 % bzw. 0,5 % der CSE-Stammlösung zu keiner signifikanten Induktion der hCAP-18-mRNA-Expression. Darüber hinaus zeigte sich, dass die durch die gemeinsame Stimulation mit Vitamin D und verschiedene PAMPs gesteigerte Induktion von hCAP-18-mRNA bei gleichzeitiger Inkubation mit CSE (in beiden Konzentrationen) signifikant inhibiert wurde.

Abbildung 19: hCAP-18-mRNA Induktion in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Vitamin D und Pam3CSK4 bzw. *P. aeruginosa* PAO1 unter dem Einfluss von Zigarettenrauch-Extrakt. Verwendet wurde CSE in einer Konzentration von 0,1 % und 0,5 %. PAO1: hitzeinaktivierte *Pseudomonas aeruginosa*;  $p < 0,05$  \*; ns: nicht signifikant.



#### 4.3.2 Zigarettenrauch-Extrakt beeinflusst die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung

Die alleinige Stimulation mit CSE in verschiedenen Konzentrationen führte bei humanen Makrophagen zu einer signifikant erhöhten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ . Bei der kombinierten Stimulation mit CSE und *P. aeruginosa* PAO1 zeigte sich ein additiver Effekt auf die Zytokinfreisetzung (siehe Abbildung 20 A). Eine gesteigerte Ausschüttung von IL-1 $\beta$  durch CSE-stimulierte

Makrophagen im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen war nicht feststellbar (siehe Abbildung 20 B).

### 4.3.3 Vitamin D beeinflusst die CSE induzierte Zytokinausschüttung

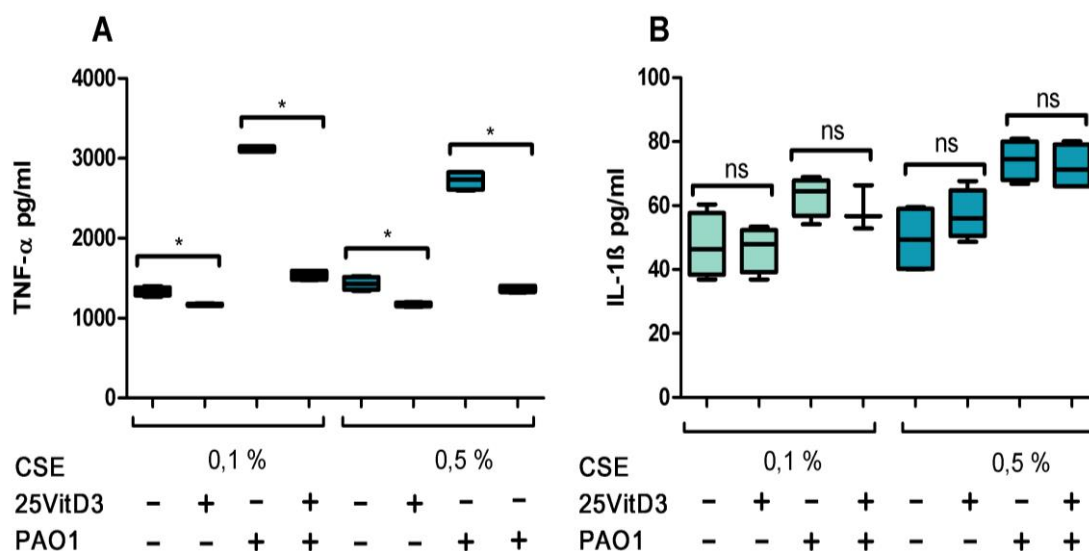
Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von CSE auf mit Vitamin D behandelte Makrophagen untersucht. Die Stimulation mit Vitamin D führte zu einer Senkung der durch CSE induzierten Ausschüttung von TNF- $\alpha$ . Durch Vitamin D ließ sich auch die durch CSE und *P. aeruginosa* PAO1 stimulierte Zytokin-Freisetzung signifikant senken (Abbildung 20 A).

Im Gegensatz dazu zeigte die Vorbehandlung mit Vitamin D keine Wirkung auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion durch die Zellen, weder bei CSE-Stimulation in beiden Konzentrationen, noch bei der Kombination von CSE und *P. aeruginosa* PAO1 (Abbildung 20 B).

Abbildung 20: Zytokinausschüttung humaner Makrophagen nach Vorbehandlung mit Vitamin D und darauf folgender Stimulation mit CSE bzw. CSE und *P. aeruginosa* PAO1.

(A) TNF- $\alpha$ -Sekretion bei Zugabe von CSE in der Konzentration 0,1 % und 0,5 %.

(B) IL-1 $\beta$ -Sekretion bei Stimulation mit 0,1 % bzw. 0,5 % CSE sowie Vitamin D &/oder *P. aeruginosa* PAO1 -Stimulation. CSE: Zigarettenrauch-Extrakt; PAO1: hitzeinaktivierte *Pseudomonas aeruginosa*;  $p < 0.05$  \*; ns: nicht signifikant





## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Vitamin D auf primäre humane Makrophagen und neutrophile Granulozyten, murine Makrophagen und immortalisierte Monozyten-Zelllinien.

Es konnte gezeigt werden, dass die parallele Stimulation primärer Makrophagen und neutrophiler Granulozyten mit Vitamin D und verschiedenen TLR-Aktivatoren zu einer gesteigerten Expression von hCAP-18-mRNA bzw. des AMPs LL-37 führt, während die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine signifikant vermindert wird. Die beobachteten Effekte gehen mit einer erhöhten Eliminationsrate von verschiedenen lebenden Bakterien einher.

Die Stimulation verschiedener Modellsysteme für primäre Makrophagen mit Vitamin D und TLR-Aktivatoren erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. In murinen Peritonealmakrophagen zeigte sich keine Beeinflussung der CRAMP-Expression durch Vitamin D, während bei den Zelllinien MonoMac6 und U937 eine gesteigerte Expression von hCAP-18-mRNA nachgewiesen werden konnte, ohne dass jedoch eine Veränderung der Zytokinausschüttung detektiert wurde.

Bei gleichzeitiger Stimulation mit Vitamin D und CSE wurde die gesteigerte Produktion von hCAP-18-mRNA in humanen Makrophagen aufgehoben. Die durch CSE ausgelöste Zytokinausschüttung wurde durch Vitamin D vermindert.

### 5.1 Die Wirkung von Vitamin D auf die Produktion antimikrobieller Peptide

Bei der Induktion der Expression von hCAP-18/LL-37 scheinen zellspezifisch unterschiedliche intrazelluläre Signalwege zum Tragen zu kommen. Während bei humanen Makrophagen Vitamin D die Expression von hCAP-18/LL-37 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene steigerte, wurde bei neutrophilen Granulozyten keine Veränderung der hCAP-18-mRNA-Expression innerhalb von 24 h beobachtet. Da aber im Überstand nach Vitamin D Stimulation eine höhere Konzentration von LL-37 nachgewiesen wurde, muss davon ausgegangen werden, dass durch Vitamin D die Freisetzung von LL-37 aus den neutrophilen Granula gesteigert wird. Da ein Großteil der granulären Proteine schon während der Entwicklung der Granulozyten im Knochenmark synthetisiert wird, erscheint die Beeinflussung der LL-37 Sekretion

auf post-translationaler Ebene bei neutrophilen Granulozyten ein sinnvoller Mechanismus (Tjabringa, Rabe, and Hiemstra 2005).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeiten konnte keine erhöhte Cathelizidin-Expression bei der alleinigen Stimulation mit TLR-Aktivatoren detektiert werden (Rivas-Santiago et al. 2008; Zanetti 2005). Mögliche Ursache für die Ergebnisse der anderen Autoren könnte die Verwendung von Serum im Versuchsmedium sein, da sowohl humanes Serum als auch FCS Vitamin D in unterschiedlichen Konzentrationen enthält. In den hier durchgeführten Versuchen wurde deshalb auf die Verwendung von Serum in den Stimulationsexperimenten verzichtet. Nur durch die gemeinsame Inkubation von 25 bzw. 1,25VitD<sub>3</sub> und PAMPs kam es zur erhöhten Produktion von hCAP-18-mRNA. Dies deckt sich mit den Befunden von Gen-Sequenzanalysen des Cathelizidin-Promotors, in dem drei VDREs beschrieben wurden, jedoch keine Bindungsstelle für NF-κB (Liu et al. 2006).

LL-37 scheint dabei nicht das einzige AMP zu sein, dessen Expression von Vitamin D beeinflusst wird. Mikroarray-Untersuchungen in anderen Arbeiten detektierten VDREs in dem codierenden Gen des hBD-2, einem AMP aus der Familie der Defensine. Die hBD-2-Expression wurde dabei, im Gegensatz zu LL-37, nur durch eine Vitamin D-induzierte VDRE- in Kombination mit einer IL-1β-induzierten NF-κB-Aktivierung gesteigert (Liu et al. 2009).

Zusammen mit dem Nachweis der Vitamin-D-abhängigen Produktion von AMPs in verschiedenen Epithelien unterstreichen die Befunde der vorliegenden Arbeit die besondere Bedeutung von Vitamin D als Immunmodulator. Die durch Vitamin D vermittelte Induktion der Expression des einzigen menschlichen Cathelizidins scheint eine Verteidigungsstrategie zu sein, die universell bei den Zellen des angeborenen Immunsystems verbreitet ist und einen wichtigen Bestandteil der „first-line defense“ des Organismus darstellt.

Klinische Daten deuten auf eine Assoziation zwischen erniedrigten Vitamin-D-Spiegeln und der Schwere sowie dem *outcome* einer diagnostizierten Sepsis bei Intensivpatienten hin (Jeng et al. 2009; Braun et al. 2011; Ginde, Camargo, and Shapiro 2011). Die Höhe der Plasmakonzentration von LL-37 korreliert mit dem gemessenen 25VitD<sub>3</sub>-Status von Sepsispatienten, was nahelegt, dass der in dieser Arbeit beobachtete *in vitro* Effekt auch auf systemischer Ebene eine Rolle spielt (Jeng et al. 2009).

## 5.2 Steigerung der Eliminationsrate lebender Bakterien durch Vitamin D

Wie sich die Modulation der Synthese von AMPs auf lebende Krankheitserreger auswirkt, wurde in einem bakteriellen Eliminationsassay, bei dem den aktivierten Zellen ein physiologisches Ziel geboten wird, analysiert.

Vitamin D stimulierte humane Makrophagen zeigten eine gesteigerte antibakterielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* PAO1 und *Staphylococcus aureus*. Um zu untersuchen, ob die Elimination der Mikroorganismen auf die vermehrte Ausschüttung des Cathelicidins zurückzuführen ist, wurde der Assay unter den gleichen Konditionen mit einem LL-37-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stamm durchgeführt. Vitamin-D-stimulierte Makrophagen zeigten gegenüber diesem Stamm keine erhöhte Eliminationsrate, was die Bedeutung von LL-37 für die durch Vitamin D ausgelöste antimikrobielle Wirkung unterstreicht. Die beobachtete Verminderung der Eliminationsrate könnte durch die Senkung pro-inflammatorischer Zytokine bedingt sein, wodurch z. B. der die Phagozytose verstärkende Einfluss von TNF- $\alpha$  herabgesetzt wird.

Die Entstehung bakterieller Antibiotikaresistenzen und ihre zunehmende Ausbreitung stellen weltweit eine wachsende Bedrohung der öffentlichen Gesundheit dar. Multiresistente Bakterienstämme sind eine der Hauptursachen für lebensbedrohliche nosokomiale Infektionen. Viele *P. aeruginosa* PAO1- und *Staphylococcus aureus*-Stämme weisen ein breites Resistenzspektrum gegen die aktuell zur Behandlung von Infektionen eingesetzten synthetischen Antibiotika auf und sind für einen Großteil der nosokomialen Infektionen verantwortlich.

Die Bildung eines bakteriellen Biofilms (Alginatmantels) stellt einen speziellen Pathogenitätsfaktor von mukoiden *P. aeruginosa* PAO1 -Stämmen dar (Bucki et al. 2010b). Der Alginatmantel schützt die Mikroorganismen vor endogenen Abwehrstrategien wie Proteasen und Defensinen, vermindert jedoch auch die Angriffsmöglichkeiten durch Medikamente. Schätzungen zufolge ist etwa die Hälfte der nosokomialen Infektionen auf chirurgische Implantationen zurückzuführen, wofür insbesondere die mikrobielle Oberflächenbesiedlung mit Biofilm-bildenden Bakterien verantwortlich gemacht wird (Patti 2005).

Endogene Antibiotika wie LL-37 entfalten ihre antimikrobielle Wirkung u. a. durch die Interaktion mit hochkonservierten Strukturen der bakteriellen Zellmembran, welche auch als „Achillesferse“ der Bakterien bezeichnet wird (Zaslouff 2002). Ihr

ungewöhnlich breites Wirkspektrum, die strukturellen Schwierigkeiten einer Resistenzentwicklung und ihre Wirksamkeit gegenüber multiresistenten Erregerstämmen machen AMPs zu vielversprechenden Kandidaten im Kampf gegen die weltweite Zunahme von Infektionen mit Antibiotika-resistenten Krankheitserregern. Schon unterhalb der für die Beeinflussung der Bakterienviabilität benötigten Konzentrationen (0,5 µg/ml) ist LL-37 zudem in der Lage, die Entstehung von Biofilmen zu hemmen. Diese Wirkung wird u. a. über genetische Inhibition erzielt, über eine Hemmung der Transkription der Enzyme für den Aufbau des Biofilms (Bucki et al. 2010b).

### 5.3 Beeinflussung der Entzündungsreaktion durch Vitamin D

Die verringerte Ausschüttung der Entzündungsmediatoren nach Vitamin-D-Stimulation könnte über eine Hemmung der NF-κB-Aktivierung vermittelt werden. In mehreren Studien zeigte sich, dass 1,25VitD3 zu einer Induktion von IκBα (*inhibitor of kappa B*) und IGFBP-3 (*insulin-like growth factor-binding protein*) führt, beides potente NF-κB-Inhibitoren (Hansdottir, Monick, Lovan, Powers, Gerke, et al. 2010; Cohen-Lahav et al. 2006; Jogie-Brahim, Feldman, and Oh 2009). Außerdem konnte in Prostatazellen eine Hemmung der nukleären Translokation der NF-κB-Untereinheit p65 nachgewiesen werden, wodurch es zu einer Störung des IL-8-Signalweges kommt (Bao, Yao, and Lee 2006).

Verschiedene Arbeiten beschreiben weiterhin eine Herabregulation von PRRs in Makrophagen durch Vitamin D, darunter TLR2, TLR4 und einigen CLRs (C-Typ Lektin-Rezeptoren), z. B. Dectin-1- und Mannose-Rezeptoren (Sadeghi et al. 2006; Khoo et al. 2011). Interessanterweise scheint es sich hier um eine zellspezifische Regulation zu handeln. So zeigen Keratinozyten im Gegensatz zu Makrophagen eine gesteigerte Expression des TLR2 nach Vitamin-D-Stimulation (Schauber et al. 2007).

Zusammen mit der Neutralisation von LPS durch LL-37 könnte dieser Effekt einen autoregulativen Mechanismus darstellen, über den einer exzessiven TLR-Aktivierung bestimmter Zellen vorgebeugt wird. Dadurch könnte eine für den Organismus schädliche überschießende Zytokinantwort des angeborenen Immunsystems verhindert werden.

Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie zeigte eine doppel-blinde, randomisierte, Placebo-kontrollierte Studie, dass die Einnahme von Vitamin D das Zytokinprofil von Patienten mit chronischem Herzversagen verbessern kann

(Schleithoff et al. 2006). Zwei aktuelle Arbeiten belegen zudem, dass erniedrigte 25VitD3-Serumlevel mit gesteigerten Entzündungsmarkern wie TNF- $\alpha$ , C-reaktives Protein (CRP) und IL-6 korrelieren (Peterson and Heffernan 2008; Amer and Qayyum 2011).

Zur Pathogenese der COPD gehört eine abnorme entzündliche Immunreaktion auf verschiedene Noxen. Virale und bakterielle Infekte sind nicht nur die häufigsten Auslöser akuter Exazerbationen, sie tragen auch wesentlich zum Fortschreiten und zur Verstärkung der chronischen Entzündung bei (Brusselle, Joos, and Bracke 2010). Die Ausschaltung des VDR in Mäusen führt zur vorzeitigen Entwicklung eines Emphysems/einer COPD und geht mit einer Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen und Immunzellen im Lungengewebe einher (Sundar et al. 2011). Darüber hinaus zeigen mehrere epidemiologische Studien eine Verbindung zwischen einer Vitamin-D-Defizienz und einer verminderten Lungenfunktion im Rahmen einer COPD (Spittler et al. 1997; Wright 2005; Black and Scragg 2005).

Über welche Schaltstellen der Vitamin-D-Metabolismus Einfluss auf die Entwicklung und Ausprägung der Erkrankung nimmt, ist noch weitgehend ungeklärt. Die Steigerung der körpereigenen Produktion von AMPs über eine VDR-Aktivierung in Verbindung mit der Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine könnte Vitamin D jedoch zu einem interessanten Wirkstoff in der Behandlung der COPD sowie weiterer Erkrankungen mit infektiös/entzündlicher Komponente machen.

## **5.4 Die Wirkung von Vitamin D auf Mausmakrophagen und Zelllinien**

### **5.4.1 Die Beeinflussung von CRAMP und hCAP-18 in Modellsystemen durch Vitamin D**

Die CRAMP-Induktion in Mausmakrophagen wird durch Vitamin D nicht beeinflusst. Gombart konnte 2011 zeigen, dass der Mensch und verschiedene Primatenarten, nicht aber Mäuse, Ratten und Hunde ein VDRE in ihrem Cathelizidin-Promoter aufweisen (Gombart 2009). Die Vitamin-D-getriggerte Expression von AMPs scheint somit ein Primaten-spezifischer Mechanismus des angeborenen Immunsystems zu sein. Möglicherweise sind unterschiedliche Lebensweisen für die Entwicklung divergenter Steuerungsmechanismen, die in unterschiedlichen antimikrobiellen Verteidigungsstrategien münden, verantwortlich. Beispielsweise verhindert eine nachtaktive und oder unterirdische Lebensweise (z. B. bei Mäusen) die UV-abhängige Vitamin-D-Synthese (Segaert 2008). Die unterschiedlichen Reaktionen

von humanen und murinen Zellen belegen, dass Mäuse sich nicht für die Untersuchung der Effekte von Vitamin D auf das angeborene Immunsystem des Menschen eignen.

Die Zelllinien U937 und MonoMac6 gelten als Modellsysteme für primäre humane Makrophagen. Bei U937 handelt es sich um eine promonozytische Zelllinie, die entsprechend ihrer Stellung im hämatopoetischen System auf der monozytären Linie zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenziert werden kann, z. B. durch Stimulation mit PMA. MonoMac6 Zellen exprimieren im Gegensatz dazu konstitutiv phänotypische und funktionelle Merkmale reifer Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al. 1988).

Bei beiden Zelllinien führte die Stimulation mit Vitamin D zu einer erhöhten Expression von hCAP-18-mRNA. Die Zelllinien zeigen damit vergleichbare Ergebnisse zur Stimulation primärer humaner Makrophagen.

#### **5.4.2 Die Beeinflussung der Zytokinexpression durch Vitamin D in verschiedenen Modellsystemen**

Die humanen Zelllinien U937 und MonoMac6 sowie murine Zellen zeigen unter den gleichen Konditionen keine mit primären humanen Zellen vergleichbaren Veränderungen der mittels ELISA gemessenen TNF- $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -Konzentration.

VDREs konnten sowohl im murinen TNF- $\alpha$  als auch im IL-1 $\beta$ -Gen nachgewiesen werden (Hakim and Bar-Shavit 2003). Nach Vitamin-D-Stimulation muriner Knochenmarkzellen (*bone marrow derived cells*; BMDC) kommt es zu einer erhöhten Expression von TNF- $\alpha$ -mRNA, ohne dass eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine detektiert werden kann (Hakim and Bar-Shavit 2003). Andere Studien wiesen in U937- und HL-60-Zellen eine Vitamin-D-abhängige Steigerung der Expression von IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -mRNA nach, auch hier setzte sich der Effekt nicht auf Proteinebene fort (Pregn et al. 1992; Bhalla et al. 1991; Fagan et al. 1991). An humanen Peritonealmakrophagen wurde dagegen in mehreren Arbeiten eine inhibitorische Wirkung von Vitamin D auf die Expression von TNF- $\alpha$  auf mRNA- und Proteinebene gezeigt (Shany, Levy, and Lahav-Cohen 2001; Cohen et al. 2001). Mögliche Ursache dieser abweichenden Befunde könnte der unterschiedliche Differenzierungs-Status der verwendeten Zellsysteme sein. So könnte das Hormon die TNF- $\alpha$ -Produktion in unreifen Zellen (Zelllinien, BMDCs) stimulieren, während es in aktivierten reifen Zellen (differenzierten PBMCs, Peritonealmakrophagen) zu einer Inhibition der Expression führt (Hakim and Bar-Shavit 2003).

Vitamin D spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation verschiedener Zellarten, u. a. für primäre Monozyten/Makrophagen sowie verschiedene monozytäre Zelllinien und Keratinozyten. Die Vitamin-D-vermittelte Expression von hKSR-1 und -2 (*human kinase suppressor of Ras*) ist essentiell für die Ausreifung von Monozyten (Wang et al. 2007; Wang et al. 2006). Daneben führt Vitamin D zur Induktion der Expression von C/EBP $\beta$ , Egr-1 (*early growth response protein 1*), AP-1 (*activator protein 1*), Sp-1/ PU.1 und CREB (*cAMP response element-binding protein*), die die Differenzierung fördern (Hughes and Brown 2009). SP-1/PU.1 ist interessanterweise auch in der Zytokin-vermittelten monozytären/granulozytären Ausreifung von Bedeutung (DeKoter, Walsh, and Singh 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass 1,25VitD3 während der monozytären Differenzierung zu einer Induktion der Expression von CD14, dem Co-Rezeptor des TLR4, auf der Zelloberfläche führt (Sadeghi et al. 2006). Ergänzt wird diese Tatsache durch die Beobachtung, dass Zytokine die Effekte von Vitamin D auf die Zelldifferenzierung beeinflussen. So wiesen Gniadecki et al. nach, dass TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  neben anderen Zytokinen für die Hemmung des klonalen Wachstums und die Induktion der Ausreifung durch das Vitamin notwendig sind (Gniadecki 1997). Des Weiteren zeigte sich, dass TNF- $\alpha$  in präkonfluenten Keratinozyten zu einer gesteigerten 1,25VitD3-Produktion führt, dieser Effekt jedoch mit dem Erreichen der Konfluenz abnimmt und schließlich sistiert (Bikle et al. 1991).

Bei der synergistischen Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen und 1,25VitD3 in unreifen Zellen könnte es sich um einen positiven Feedback-Mechanismus handeln, der in eine autokrine Differenzierungsstimulation mündet. Dadurch könnte der Körper sicherstellen, dass es im Bereich einer Entzündung zur schnellen Ausreifung frisch rekrutierter Monozyten kommt. Mit der vollendeten Ausreifung wird der positive Feedback-Mechanismus unterbrochen, um einer Schädigung des Organismus durch eine gesteigerte Ausschüttung bioaktiver Substanzen beziehungsweise einer Überproduktion von 1,25VitD3 vorzubeugen. Diese Regulationsmechanismen könnten über die Beteiligung von SOCS (*suppressor of cytokine signaling proteins*)-Genen vermittelt werden. SOCS sind eine Gruppe von intrazellulären Proteinen, die als Schlüsselregulatoren der Zytokinantwort dienen (Alexander 2002). SOCS-2-mRNA- und Protein-Level scheinen darüber hinaus während der Ausreifung Antigen-präsentierender Zellen zuzunehmen (Hu et al. 2009). Im Rahmen der Zellreifung könnte die Induktion von SOCS, abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen, die Hemmung proinflammatorischer Zytokine durch

Vitamin D regulieren. Allerdings zeigte eine Studie, in der die Regulation von SOCS-1 und -3 untersucht wurde, keine Veränderung der Expression auf mRNA-Ebene durch Vitamin D (Khoo et al. 2011).

## 5.5 Interaktion zwischen Zigarettenrauch und Vitamin D

Die Vitamin-D-vermittelte Expression von hCAP-18-mRNA wurde durch CSE signifikant inhibiert. Ein komplexes Bild ergab sich bei der Untersuchung der Wirkung von CSE auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen. CSE alleine führte zu einer vermehrten Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , nicht aber von IL-1 $\beta$ . Die gleichzeitige Inkubation mit *P. aeruginosa* PAO1 zeigte dabei einen additiven Effekt. Durch die Vorbehandlung der Zellen mit Vitamin D wurde in beiden Fällen (CSE; CSE + *P. aeruginosa* PAO1) die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung vermindert.

Diese Ergebnisse müssen vor dem Hintergrund der methodischen Schwierigkeiten einer physiologischen Nachahmung der Rauchexposition bei in vitro Versuchen bewertet werden. Im Organismus stellen Atemwegsepithelzellen die erste Barriere dar, die mit inhaliertem Zigarettenrauch in Kontakt kommt. *Air-liquid interface*-Kulturen simulieren die Situation in vivo für diese Zellart am besten. Makrophagen finden sich in den Atemwegen im Gewebe und der Atemwegsflüssigkeit und kommen vor allem mit den gelösten Bestandteilen des Zigarettenrauchs in Kontakt. Flüssige Extrakte von Zigarettenrauch enthalten nur wasserlösliche Komponenten der partikel- und gasförmigen Phase und erschienen deshalb für den vorliegenden Versuchsaufbau am besten geeignet. Die Gasphase des Zigarettenrauchs enthält hochreaktive freie Radikale, die kontinuierlich durch die Oxidation von Stickstoffmonoxid zu -dioxid entstehen und direkt mit den umgebenden organischen Bestandteilen weiter reagieren (Church and Pryor 1985; Santanam et al. 1997). In einer physiologischen Umgebung können freie Radikale durch endogene antioxidative Systeme zum Teil abgefangen werden (Herr et al. 2008). Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Zusammensetzung des CSE durch die zellfreie Produktion mit den in vivo Verhältnissen nicht komplett identisch ist.

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Zigarettenrauch die antimikrobielle Wirkung von Vitamin D stört und die gesteigerte Expression von hCAP-18 nach bakterieller Stimulation unterdrückt. Unklar bleibt, über welchen Mechanismus diese Inhibition erfolgt. Die antiinflammatorische Wirkung von Vitamin D wird jedoch scheinbar nicht beeinträchtigt. Um sicherzustellen, dass die



Inhibition der AMP-Expression sowie die verminderte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  nach CSE-, *P. aeruginosa* PAO1- und Vitamin-D-Stimulation nicht auf zytotoxische Effekte zurückzuführen sind, wurde die Zellviabilität mittels Trypanblau-Vitalfärbung überprüft. Für alle Stimulationskonditionen lag die Zellviabilität zwischen 80–90 %.

Die Aktivierung von TLR-Rezeptoren löst in Makrophagen über den NF- $\kappa$ B-, JAK-STAT- und p38/MAPK-Signalweg eine gesteigerte Expression der CYP27B1 und des VDRs aus (Stoffels et al. 2006). Über Umwandlung von 25VitD3 in das aktive Hormon und die Bindung an den VDR kommt es zur Induktion des humanen Cathelizidins LL-37. Wie oben beschrieben, besitzt der Cathelizidin-Promoter drei VDREs aber keine NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle (Liu et al. 2006).

Zigarettenrauch kann die Bildung von 1,25VitD3 signifikant reduzieren (Hansdottir, Monick, Lovan, Powers, and Hunninghake 2010). Dieser Effekt könnte über Acrolein vermittelt werden, ein reaktives Aldehyd, das bei der Verbrennung organischer Substanzen entsteht und in Versuchen einen hemmenden Effekt auf die Syntheseleistung der CYP27B1 zeigt. Gleichzeitig fördert Zigarettenrauch scheinbar den Katabolismus von Vitamin D. So führt die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors durch Zigarettenrauch-Metaboliten (z. B. 1,2-Benzpyren und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin) zur Induktion der Expression von CYP24A1 und steigert den Katabolismus von 1,25VitD3 durch das Enzym (Matsunawa et al. 2009). Die Störung des Vitamin-D-Metabolismus durch Hemmung der Synthese und Förderung des Abbaus des biologisch aktiven Hormons stellt möglicherweise einen Mechanismus dar, der der CSE-vermittelten Aufhebung der Induktion der hCAP-18-Expression zugrunde liegt.

Die weiterhin bestehende antiinflammatorische Wirkung von Vitamin D kann durch diesen Mechanismus nicht erklärt werden. Die Ergebnisse mehrerer Studien legen nahe, dass die beobachtete CSE-induzierte Zytokinausschüttung in humanen Makrophagen vor allem auf einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch Zigarettenrauch beruht (Yang et al. 2006; Ito et al. 2001; Xu, Xu, and Lin 2011). Wie vorangehend beschrieben, kann Vitamin D die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch die Induktion inhibitorischer Proteine wie I $\kappa$ B $\alpha$  vermindern. Daneben scheint es jedoch auch zu einer physikalischen Interaktion des VDRs mit p65 zu kommen, einer Untereinheit des NF- $\kappa$ B-Komplexes (Lu et. al 2004). Die funktionelle Signifikanz dieser VDR-p65-Verbindung bleibt noch zu erforschen. Es wurde jedoch gezeigt, dass die nukleäre Translokation von p65 nach Zytokinstimulation durch Vitamin D vermindert wird und

---

dies in einer Unterbrechung des IL-8-Signalweges resultiert (Penna et al. 2007; Tan, Wen, and Liu 2008).

Damit könnte es sich bei der antiinflammatorischen Wirkung von Vitamin D nicht um eine direkte Hemmung auf transkriptionaler/translationaler Ebene handeln, sondern vielmehr um eine über Protein-Interaktion vermittelte Inhibition. Wie im Ergebnisteil beschrieben, führt die Inkubation von humanen Makrophagen mit dem TLR1/2-Liganden Pam3CSK4 innerhalb von 2 h zu einer signifikanten Erhöhung der VDR-mRNA-Expression. Über die VDR-p65-Interaktion könnte damit die Zytokinausschüttung unabhängig von der 1,25VitD3-Synthese sowie der Cathelizidin-Produktion reguliert werden.

## 6 Ausblick

In der aktuellen Literatur findet man widersprüchliche Ergebnisse zur Vitamin-D-Wirkung. Dies lässt sich zumindest zum Teil auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen wie die Verwendung verschiedener Vitamin-D-Konzentrationen und spezie- bzw. zellspezifische Abweichungen zwischen den untersuchten Modellsystemen zurückführen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane Makrophagen und neutrophile Granulozyten, immortalisierte Monozyten und murine Makrophagen durch die Stimulation mit Vitamin D in ihrer Reaktion auf bakterielle Pathogene beeinflusst werden. Den beobachteten Effekten liegt eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zugrunde. Weiterhin legen die Ergebnisse zur Expression von antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen nahe, dass diese Wirkung in verschiedenen Zelltypen über unterschiedliche Signalwege reguliert wird. Dabei wird der Vitamin-D-Effekt wahrscheinlich über den VDR auf transkriptionalen/translationalen Signalwegen aber auch durch Protein-Interaktion des Rezeptors und Aktivierung von Transmembranrezeptoren vermittelt. Der durchgeführte Vergleich zwischen der Reaktion von humanen Monozyten und Makrophagen weist ausserdem auf einen Zusammenhang zwischen der Rolle, die Vitamin D in der Zelldifferenzierung zukommt, und der Modulation der Immunantwort hin und stellt einen Ansatzpunkt für weiterreichende Arbeiten dar.

Die gesteigerte Ausschüttung von LL-37 bzw. verminderte Ausschüttung wichtiger proinflammatorischer Zytokine in humanen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wirft die Frage auf, ob die Stimulation mit Vitamin D auch auf Lungenepithelzellen eine ähnliche Wirkung entfaltet. An *Air-liquid interface*-Kulturen humaner Epithelzellen, der ersten Barriere mit der inhalierter Zigarettenrauch in Kontakt kommt, liesse sich sowohl der Einfluss von Vitamin D als auch die Beeinflussung der Reaktion durch Zigarettenrauch untersuchen.

Während sich die Hinweise auf eine antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkung von Vitamin D durch in vitro Experimente und epidemiologische Studien mehren, fehlen bislang ausreichende Untersuchungen der Immunmodulation in vivo. Interessante Daten sind hier von der VITAL-Studie (VITamin D and Omega-3 Trial) zu erwarten, einer randomisierten, placebo-kontrollierten Studie zur Wirkung von Vitamin D und Omega-3-Fettsäuren an 20.000 gesunden Männern und Frauen, deren erste Ergebnisse 2016 erwartet werden.

## 7 Literaturverzeichnis

Aderem, A., Ulevitch, R. J. 2000. „*Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*“. *Nature* 406 (6797): 782–787.

Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, F., Jörnvall, H., Wigzell, H., Gudmundsson, G. H. 2000. „*The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations*“. *Blood* 96 (9): 3086–3093.

Alexander, W. S. 2002. „*Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system*“. *Nature reviews. Immunology* 2 (6): 410–416.

Aloia, J. F. 2011. „*Review: The 2011 Report on Dietary Reference Intake for Vitamin D: Where Do We Go From Here?*“. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* 96 (10): 2987-2996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795456>.

Amer, M., Qayyum, R. 2011. „*Relation Between Serum 25-Hydroxyvitamin D and C-Reactive Protein in Asymptomatic Adults (From the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006)*“. *The American journal of cardiology* 109 (2): 226-230.

Bals, R. 2000. „*Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*“. *Respiratory research* 1(3): 141–150.

Bals, R., Hiemstra, P. S. 2006. „*Antimicrobial peptides in COPD--basic biology and therapeutic applications*“. *Current drug targets* 7 (6): 743–750.

Bals, R., Wilson, J. M. 2003. „*Cathelicidins - a family of multifunctional antimicrobial peptides*“. *Cellular and molecular life sciences* 60 (4): 711–720.

Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., Wilson, J. M. 1998. „*The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface*“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (16): 9541–9546.

Bao, B., Yao, J., Lee, J. 2006. „*1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis*“. *Carcinogenesis* 27 (9): 1883–1893.

Bartley, J. 2010. „*Vitamin D, innate immunity and upper respiratory tract infection*“. *The Journal of laryngology and otology* 124 (5): 465–469.

- Beutler, B., Cerami, A. 1988. „*Tumor Necrosis, Cachexia, Shock, and Inflammation: A Common Mediator*“. Annual review of biochemistry 57(6): 505–518.
- Bhalla, A. K., Paavonen, T., Williams, M. M., Delves, P. J., Lydyard, P. M. 1991. „*Regulation of interleukin-1 and tumour necrosis factor gene expression in myelomonocytic cell lines by 1,25-dihydroxyvitamin D3*“. Immunology 72 (1): 61–64.
- Bikle, D. D., Pillai, S., Gee, E., Hincenbergs, M. 1991. „*Tumor necrosis factor-alpha regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production by human keratinocytes*“. Endocrinology 129 (1): 33–38.
- Black, P. N., Scragg, R. 2005. „*Relationship between serum 25-hydroxyvitamin d and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey*“. Chest 128 (6): 3792–3798.
- Blanco, J. C., Wang, I. M., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., Jurutka, P. W., Haussler, M. R., Ozato, K. 1995. „*Transcription factor TFIIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription*“. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92 (5): 1535–1539.
- Boonstra, A., Barrat, F. J., Crain, C., Heath, V. L., Savelkoul, H. F., O'Garra, A. 2001. „*1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells*“. Journal of immunology 167 (9): 4974–4980.
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., Lau, Y. E., Lee, K., Scott, M. G., Hancock, R. E. W. 2005. „*Impact of LL-37 on anti-infective immunity*“. Journal of leukocyte biology 77 (4): 451–459.
- Braun, A. B., Gibbons, F. K., Litonjua, A. A., Giovannucci, E., Christopher, K. B. 2011. „*Low serum 25-hydroxyvitamin D at critical care initiation is associated with increased mortality*“. Critical care medicine 40 (1): 63-72.
- Bréchet, N., Gomez, E., Bignon, M., Khallou-Laschet, J., Dussiot, M., Cazes, A., Alanio-Bréchet, C. u. a. 2008. „*Modulation of Macrophage Activation State Protects Tissue from Necrosis during Critical Limb Ischemia in Thrombospondin-1-Deficient Mice*“. PLoS one 3 (12): e3950. doi: 10.1371/journal.phone.0003950.
- Brusselle, G. G., Joos, G. F., Bracke, K. R. 2011. „*New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease*“. Lancet 378 (9795):1015–1026.
- Bucki, R., Leszczyńska, K., Namiot, A., Sokołowski, W. 2010a. „*Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide*“. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis 58 (1): 15–25.

- Buitrago, C., Boland, R. 2010. „*Caveolae and caveolin-1 are implicated in 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ -dependent modulation of Src, MAPK cascades and VDR localization in skeletal muscle cells*“. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 121 (1-2): 169–175.
- Burke, B., Sumner, S., Maitland, N., Lewis, C. E. 2002. „*Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets*“. Journal of leukocyte biology 72 (3): 417–428.
- Burton, M. F., Steel, P. G. 2009. „*The chemistry and biology of LL-37*“. Natural product report 26 (12): 1572-1584.
- Cannell, J. J., Vieth, R., Umhau, J. C., Holick, M. F., Grant, W. B., Madronich, S., Garland, C. F., Giovannucci, E. 2006. „*Epidemic influenza and vitamin D*“. Epidemiology and infection 134(6): 1129–1140.
- Chen, S., Sims, G. P., Chen, X. X., Gu, Y. Y., Chen, S., Lipsky, P. E. 2007. „*Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D $_3$  on Human B Cell Differentiation*“. Journal of immunology 179 (3): 1634–1647.
- Ching, S., Kashinkunti, S., Niehaus, M. D., Zinser, G. . 2011. „*Mammary adipocytes bioactivate 25-hydroxyvitamin D(3) and signal via vitamin D(3) receptor, modulating mammary epithelial cell growth*“. Journal of cellular biochemistry 112 (11): 3393-3405.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. „*Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*“. Analytical biochemistry 162 (1): 156–159.
- Christakos, S., Ajibade, D. A., Dhawan, P., Fechner, A. J., Mady, L. J. 2010. „*Vitamin D: metabolism*“. Endocrinology and metabolism clinics of North America 39 (2): 243–253, table of contents.
- Church, D. F., Pryor, W. A. 1985. „*Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications*“. Environmental health perspectives 64: 111–126.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Bergnach, C., Orlando, F., Silvestri, C., Mocchegiani, F. u. a. 2006. „*LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria*“. Antimicrobial agents and chemotherapy 50 (5): 1672–1679.
- Cohen, M. L., Douvdevani, A., Chaimovitz, C., Shany, S. 2001. „*Regulation of TNF- $\alpha$  by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D $_3$  in human macrophages from CAPD patients*“. Kidney international 59 (1): 69–75.
- Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, C. Douvdevani, A. 2006.

„Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels“. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association* 21 (4): 889–897.

Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S. D., Bowdish, D. M. E., MacDonald, K. L., Ma, R. C., Hancock, R. E. W., Speert, D. P. 2004. „*The Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Dendritic Cell Differentiation and Dendritic Cell-Induced T Cell Polarization*“. *Journal of immunology* 172 (2): 1146–1156.

Dawson-Hughes, B., Heaney, R. P., Holick, M. F., Lips, P., Meunier, P. J., Vieth, R. 2005. „*Estimates of optimal vitamin D status*“. *Osteoporosis international* 16 (7): 713–716.

DeKoter, R. P., Walsh, J. C., Singh, H. 1998. „*PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors*“. *The EMBO Journal* 17 (15): 4456–4468.

Diamond, G., Beckloff, N., Ryan, L. K. 2008. „*Host Defense Peptides in the Oral Cavity and the Lung: Similarities and Differences*“. *Journal of dental research* 87 (10): 915–927.

Dinarello, C. A. 2011. „*A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation*“. *European journal of immunology* 41 (5): 1203–1217.

Doss, M., White, M. R., Tecle, T., Hartshorn, K. L. 2010. „*Human defensins and LL-37 in mucosal immunity*“. *Journal of leukocyte biology* 87 (1): 79–92.

van Driel, M., Koedam, M., Buurman, C. J., Hewison, M., Chiba, H., Uitterlinden, A. G., Pols, H. A. P., van Leeuwen, J. P. T. M. 2006. „*Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1 $\alpha$ -hydroxylase expression and activity in human bone cells*“. *FASEB journal* 20 (13): 2417–2419.

Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S., Ramamoorthy, A. 2006. „*LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides*“. *Biochimica et biophysica acta* 1758 (9): 1408–1425.

Dusso, A. S., Brown, A. J., Slatopolsky, E. 2005. „*Vitamin D*“. *American journal of physiology. Renal physiology* 289 (1): F8–F28.

Elenkov, I. J., Iezzoni, D. G., Daly, A., Harris, A. G., Chrousos, G. P. 2005. „*Cytokine dysregulation, inflammation and well-being*“. *Neuroimmunomodulation* 12 (5): 255–269.

Engvall, E., Perlmann, P. 1971. „*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*“.

- Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry* 8 (9): 871–874.
- Eyles, D. W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., McGrath, J. J. 2005. „*Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain*“. *Journal of chemical neuroanatomy* 29 (1): 21–30.
- Fagan, D. L., Prehn, J. L., Adams, J. S., Jordan, S. C. 1991. „*The human myelomonocytic cell line U-937 as a model for studying alterations in steroid-induced monokine gene expression: marked enhancement of lipopolysaccharide-stimulated interleukin-1 beta messenger RNA levels by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>*“. *Molecular endocrinology* 5 (2): 179–186.
- Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U. u. a. 2008. „*Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling*“. *Journal of leukocyte biology* 83 (3): 692–701.
- Feldman, D., Glorieux, F. H., Pike, J. W. 2011. *Vitamin D*. Gulf Professional Publishing.
- Foell, D., Kucharzik, T., Kraft, M., Vogl, T., Sorg, C., Domschke, W., Roth, J. 2003. „*Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease*“. *Gut* 52 (6): 847–853.
- Frink, M., Hsieh, Y., Hsieh, C., Pape, H., Choudhry, M. A., Schwacha, M. G., Chaudry, I. H. 2007. „*Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage*“. *Shock* 28 (5): 576–581.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stähle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H., Gudmundsson, G. H. 1997. „*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): 15258–15263.
- Gallo, R. L., Kim, K. J., Bernfield, M., Kozak, C. A., Zanetti, M., Merluzzi, L., Gennaro, R. 1997. „*Identification of CRAMP, a Cathelin-related Antimicrobial Peptide Expressed in the Embryonic and Adult Mouse*“. *The Journal of biological chemistry* 272 (20): 13088–13093.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M. 1996. „*A novel method for real time quantitative RT-PCR*“. *Genome Research* 6 (10): 995–1001.
- Ginde, A. A., Camargo, C. A. Jr, Shapiro, N. I. 2011. „*Vitamin D insufficiency and*



*sepsis severity in emergency department patients with suspected infection*". Academic emergency medicine 18 (5): 551–554.

Ginde, A. A., Mansbach, J. M., Camargo, C. A. Jr. 2009. „*Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey*". Archives of internal medicine 169 (4): 384–390.

Gniadecki, R. 1997. „*Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its 20-epi analogues (MC 1288, MC 1301, KH 1060), on clonal keratinocyte growth: evidence for differentiation of keratinocyte stem cells and analysis of the modulatory effects of cytokines*". British journal of pharmacology 120 (6): 1119–1127.

Gocek, E., Studzinski, G. P. 2009. „*Vitamin D and differentiation in cancer*". Critical reviews in clinical laboratory sciences 46 (4): 190–209.

Goeddel, D. V., Aggarwal, B. B., Gray, P. W., Leung, D. W., Nedwin, G. E. Palladino, M. A., Patton, J., Pennica, D., Shepard, H. M., Sugarman, B. J. 1986. „*Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities*". Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (51 Pt 1): 597–609.

Gombart, A. F. 2009. „*The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection*". Future microbiology 4 (9): 1151–1165.

Gombart, A. F., Borregaard, N., Koeffler, H. P. 2005. „*Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>*". FASEB journal 19 (9): 1067–1077.

Goulding, N. J., Euzger, H. S., Butt, S. K., Perretti, M. 1998. „*Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation*". Inflammation research 47 (Suppl 3): 158–165.

Gudmundsson, H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., Salcedo, R. 1996. „*The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes*". European journal of biochemistry / FEBS 238 (2): 325–332.

Haddad, J. G., Matsuoka, L. Y., Hollis, B. W., Hu, Y. Z., Wortsman, J. 1993. „*Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis*". 91 (6): 2552–2555.

Hakim, I., Bar-Shavit, Z. 2003. „*Modulation of TNF-alpha expression in bone marrow macrophages: involvement of vitamin D response element*". Journal of cellular

biochemistry 88 (5): 986–998.

Hansdottir, S., Monick, M.M., Lovan, N., Powers, L. S., Gerke, A., Hunninghake, G. W. 2010. „*Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF-kappaB-linked chemokines and cytokines in airway epithelium while maintaining the antiviral state*“. Journal of immunology 184 (2): 965–974.

Hansdottir, S., Monick, M. M., Lovan, N., Powers, L. S., Hunninghake, G. W. 2010. „*Smoking Disrupts Vitamin D Metabolism In The Lungs*“. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 181: A1425.

Haussler, M. R., Norman, A. W. 1969. „*Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite*“. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 62 (1): 155–162.

Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Hsieh, J-C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., Dominguez, C. E., Jurutka, P. W. 1998. „*The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed*“. Journal of bone and mineral research 13 (3): 325–349.

Heaney, R. P., Dowell, M. S., Hale, C. A., Bendich, A. 2003. „*Calcium Absorption Varies within the Reference Range for Serum 25-Hydroxyvitamin D*“. Journal of the American college of nutrition 22 (2): 142–146.

Herr, C., Kandler, K., Beisswenger, C., Hess, C., Suttorp, N., Welte, T., Schröder, J-M., Vogelmeier, C., Bals, R. 2008. „*Suppression of pulmonary innate host defense in smokers*“. Thorax 64 (2): 144-149.

Herr, C., Shaykhiev, R., Bals, R. 2007. „*The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases*“. Expert opinion on biological therapy 7 (9): 1449–1461.

Hewison, M. 2010. „*Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme*“. Endocrinology and metabolism clinics of North America 39 (2): 365–379.

Hirata, M., Shimomura, Y., Yoshida, M., Morgan, J. G., Palings, I., Wilson, D., Yen, M. H., Wright, S. C., Larrick J. W. 1994. „*Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity*“. Infection and immunity 62 (4): 1421–1426.

Holick, M. F. 1995. „*Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D*“. The American journal of clinical nutrition 61 (3): 638S–645S.

Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A.,

- Heaney, R. P., Murad, M. H., Weaver, C. M. 2011. „*Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline*“. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 96 (7): 1911-1930.
- Holick, M. F., Matsuoka, L. Y. Wortsman, J. 1989. „*Age, Vitamin D, and solar ultraviolet*“. Lancet 2 (8671): 1104–1105.
- Hollander, D. 1981. „*Intestinal absorption of vitamins A, E, D, and K*“. The Journal of laboratory and clinical medicine 97 (4): 449–462.
- Hollis, B. W. 2005. „*Circulating 25-Hydroxyvitamin D Levels Indicative of Vitamin D Sufficiency: Implications for Establishing a New Effective Dietary Intake Recommendation for Vitamin D*“. The Journal of nutrition 135 (2): 317–322.
- Hu, J., Winqvist, O., Flores-Morales, A., Wikström, A. Norstedt, G. 2009. „*SOCS2 Influences LPS Induced Human Monocyte-Derived Dendritic Cell Maturation*“. PLoS one 4(9): e7178.doi: 10.1371/journal.phone.0007178.
- Huang, L. C., Reins, R. Y., Gallo, R. L., McDermott, A. M. 2007. „*Cathelicidin-Deficient (Cnlp<sup>-/-</sup>) Mice Show Increased Susceptibility to Pseudomonas aeruginosa Keratitis*“. Investigative ophthalmology & visual science 48 (10): 4498–4508.
- Hughes, P. J., Brown, G. 2009. „*Interplay between signalling pathways mediates 1,25 $\alpha$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-driven monocytic differentiation—JNKs are important*“. Leukemia research 33 (10): 1298–1300.
- Ito, K., Lim, S., Caramori, G., Chung, K. F., Barnes, P. J., Adcock, I. M. 2001. „*Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages*“. FASEB journal 15 (6): 1110–1112.
- Izadpanah, A., Gallo, R. L. 2005. „*Antimicrobial peptides*“. Journal of the American Academy of Dermatology 52 (3 Pt 1): 381–390.
- Janeway, C. A. Jr. 1992. „*The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*“. Immunology today 13 (1): 11–16.
- Janssens, W., Bouillon, R., Claes, B., Carremans, C., Lehouck, A., Buyschaert, I., Coolen, J., Mathieu, C., Decramer, M., Lambrechts, D. 2009. „*Vitamin D Deficiency is Highly Prevalent in COPD and Correlates with Variants in the Vitamin D Binding Gene*“. Thorax 65 (3): 215-20.
- Jeng, L., Yamshchikov, A. V., Judd, S. E., Blumberg, H. M., Martin, G. S., Ziegler, T. R., Tangpricha, V. 2009. „*Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide*

*levels in patients in the intensive care unit with sepsis*". Journal of translational medicine 7: 28.

Jeong, E., Lee, J. Y. 2011. „*Intrinsic and Extrinsic Regulation of Innate Immune Receptors*". Yonsei medical journal 52 (3): 379–392.

Jogie-Brahim, S., Feldman, D., Oh, Y. 2009. „*Unraveling Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Actions in Human Disease*". Endocrine reviews 30 (5): 417–437.

Jones, G. 2008. „*Pharmacokinetics of vitamin D toxicity*". The American journal of clinical nutrition 88 (2): 582S–586S.

Kent, L., Smyth, L., Clayton, C., Scott, L., Cook, T., Stephens, R., Fox, S., Hext, P., Farrow, S., Singh, D. 2008. „*Cigarette smoke extract induced cytokine and chemokine gene expression changes in COPD macrophages*". Cytokine 42 (2): 205–216.

Khoo, A., Chai, L Y. A., Koenen, H. J. P. M., Oosting, M., Steinmeyer, A. Zuegel, U., Joosten, I., Netea, M. G., van der Ven. A. J. A. M. 2011. „*Vitamin D3 down-regulates proinflammatory cytokine response to Mycobacterium tuberculosis through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production*". Cytokine 55 (2): 294–300.

Kim, M., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamaoka, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K., Kato, S. 2007. „*1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter*". Molecular endocrinology 21 (2): 334–342.

Kim, S., Yamazaki, M., Zella, L. A., Shevde, N. K., Pike. 2006. J. P. „*Activation of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$  is mediated through multiple long-range enhancers*". Molecular and cellular biology 26 (17): 6469–6486.

Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K. u. a. 2003. „*An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18*". The Journal of clinical investigation 111 (11): 1665–1672.

Krutzik, S. R., Hewison, M., Liu, P. T., Robles, J. A., Stenger, S., Adams, J. S. Modlin, R. L. 2008. „*IL-15 Links TLR2/1-Induced Macrophage Differentiation to the Vitamin D-Dependent Antimicrobial Pathway*". Journal of immunology 181 (10): 7115–7120.

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. 2011. „*Pathogen recognition by the innate immune system*". International reviews of immunology 30 (1): 16–34.

Kurosaka, K., Chen, Q., Yarovinsky, F., Oppenheim, J. J., De Yang, V. 2005. „*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*". *Journal of immunology* 174 (10): 6257–6265.

Laemmli, U. K. 1970. „*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*“. *Nature* 227 (5259): 680–685.

Lagishetty, V., Chun, R. F., Liu, N. Q., Lisse, T. S., Adams, J. S., Hewison, M. 2010. „*1 $\alpha$ -hydroxylase and innate immune responses to 25-hydroxyvitamin D in colonic cell lines*“. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 121 (1-2): 228–233.

Laskin, D. L., Sunil, V. R., Gardner, C. R., Laskin, J. D. 2011. „*Macrophages and Tissue Injury: Agents of Defense or Destruction?*“. *Annual review of pharmacology and toxicology* 51: 267–288.

Lee, S., Clark, S. A., Gill, R. K., Christakos, S. 1994. „*1,25-Dihydroxyvitamin D3 and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion*“. *Endocrinology* 134 (4): 1602–1610.

Leijh, P. C., van den Barselaar, M. T., van Zwet, T. L., Dubbeldeman-Rempt, I., van Furth, R. 1979. „*Kinetics of phagocytosis of Staphylococcus aureus and Escherichia coli by human granulocytes*“. *Immunology* 37 (2): 453–465.

Lemire, J. M., Archer, D. C., Beck, L., Spiegelberg, H. L. 1995. „*Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions*“. *The Journal of nutrition* 125 (6 Suppl): 1704S–1708S.

Lin, R., White, J. H. 2004. „*The pleiotropic actions of vitamin D*“. *Bioessays* 26 (1): 21–28.

Lips, P., Wiersinga, A., van Ginkel, F. C., Jongen, M. J., Netelenbos, J. C., Hackeng, W. H., Delmas, P. D., van der Vijgh, W. J. 1988. „*The effect of vitamin D supplementation on vitamin D status and parathyroid function in elderly subjects*“. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 67 (4): 644–650.

Liu, N., Kaplan, A. T., Low, J., Nguyen, L., Liu, G. Y., Equils, O., Hewison, M. 2009. „*Vitamin D Induces Innate Antibacterial Responses in Human Trophoblasts via an Intracrine Pathway*“. *Biology of reproduction* 80 (3): 398–406.

Liu, P. T., Schenk, M., Walker, V. P., Dempsey, P. W., Kanchanapoomi, M., Wheelwright, M., Vazirnia, A. u. a. 2009. „*Convergence of IL-1 $\beta$  and VDR Activation Pathways in Human TLR2/1-Induced Antimicrobial Responses*“. *PLoS one* 4 (6):

e5810. doi: 10.1371/journal.phone.0005810.

Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T. u. a. 2006. „*Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response*“. *Science* 311 (5768): 1770–1773.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. „*Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*“. *Methods* 25 (4): 402–408.

Lu, X., Farmer, P. Rubin, J., Nanes, M. S. 2004. „*Integration of the NfkappaB p65 subunit into the vitamin D receptor transcriptional complex: identification of p65 domains that inhibit 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated transcription*“. *Journal of cellular biochemistry* 92 (4): 833–848.

Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S., Makishima, M. 2009. „*The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D3 catabolism in macrophages*“. *Toxicological sciences* 109 (1): 50–58.

Matsuoka, L. Y., Wortsman, J., Haddad, J. G., Hollis, B. W. 1989. „*In vivo threshold for cutaneous synthesis of vitamin D3*“. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 114 (3): 301–305.

Mbow, M. L., Sarisky, R. T. 2005. „*Modulating toll-like receptor signalling as a novel antiinfective approach*“. *Drug news & perspectives* 18 (3): 179–184.

Medzhitov, R. 2007. „*Recognition of microorganisms and activation of the immune response*“. *Nature* 449 (7164): 819–826.

Menegaz, D., Mizwicki, M. T., Barrientos-Duran, A., Chen, N., Henry, H. L., Norman, A. W. 2011. „*Vitamin D Receptor (VDR) Regulation of Voltage-Gated Chloride Channels by Ligands Preferring a VDR-Alternative Pocket (VDR-AP)*“. *Molecular endocrinology* 25 (8): 1289–1300.

Meyer, M. B., Watanuki, M., Kim, S., Shevde, N. K., Pike, J. W. 2006. „*The human transient receptor potential vanilloid type 6 distal promoter contains multiple vitamin D receptor binding sites that mediate activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal cells*“. *Molecular endocrinology* 20 (6): 1447–1461.

Mohr, W. 2003. „*Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction VIII. Considerations on the inflammatory cartilage destruction in chronic arthritides in comparison with liver injuries by PMN's*“. *Zeitschrift für Rheumatologie* 62 (6): 539–546; discussion 547.

- Mullis, K. B., Faloona, F. A. 1987. „*Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*“. *Methods in enzymology* 155: 335–350.
- Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Koderu, Y., Hosoya, T., Kato, S. 1998. „*The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 alpha,25(OH)2D3*“. *Biochemical and biophysical research communications* 249 (1): 11–16.
- O'Neill, L. A. J. 2008. „*The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress*“. *Immunological Reviews* 226 (1): 10–18.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., Aderem, A. 2000. „*The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors*“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (25): 13766–13771.
- Park, K., Elias, P. M., Oda, Y., Mackenzie, D., Mauro, T., Holleran, W. M., Uchida, Y. 2011. „*Regulation of Cathelicidin Antimicrobial Peptide Expression by an Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Signaling, Vitamin D Receptor-independent Pathway*“. *The Journal of biological chemistry* 286 (39): 34121–34130.
- Patti, J. M. 2005. „*Vaccines and immunotherapy for staphylococcal infections*“. *The International journal of artificial organs* 28 (11): 1157–1162.
- Penna, G., Amuchastegui, S., Giarratana, N., Daniel, K. C., Vulcano, M., Sozzani, S., Adorini, L. 2007. „*1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells*“. *Journal of immunology* 178 (1): 145-153.
- Peterson, C. A., Heffernan, M. E. 2008. „*Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women*“. *Journal of inflammation* 24 (5): 10.
- Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B. E., Dal Cin, E., Allavena, P., Di Carlo, V. 2000. „*Vitamin D3 Affects Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells*“. *Journal of immunology* 164 (9): 4443 – 4451.
- Pike, J. W., Meyer, M. B. 2010. „*The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D3*“. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 39 (2): 255–269.

- Platt, N., da Silva, R. P., Gordon, S. 1998. „*Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells*“. Trends in cell biology 8 (9): 365–372.
- Polly, P., Herdick, M., Moehren, U., Baniahmad, A., Heinzl, T., Carlberg, C. 2000. „*VDR-Alien: a novel, DNA-selective vitamin D(3) receptor-corepressor partnership*“. FASEB journal 14 (10): 1455–1463.
- Prehn, J. L., Fagan, D. L., Jordan, S. C. Adams, J. S. 1992. „*Potential of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3*“. Blood 80 (11): 2811–2816.
- „*Presse-Informationen der DGE*“. 2011.  
[http://www.endokrinologie.net/presse\\_110208.php](http://www.endokrinologie.net/presse_110208.php).(abgerufen am 13.07.2011)
- Provvedini, D. M., Tsoukas, C. D., Defetos, L. J., Manolagas, S. C. 1983. „*1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes*“. Science 221 (4616): 1181–1183.
- Ramagopalan, S. V., Heger, A., Berlanga, A. J., Maugeri, N. J., Lincoln, M. R., Burrell, A., Handunnetthi, L. u. a. 2010. „*A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution*“. Genome research 20 (10): 1352–1360.
- Reichel, H., Koeffler, H. P., Norman, A. W. 1989. „*The role of the vitamin D endocrine system in health and disease*“. The New England journal of medicine 320 (15): 980–991.
- Reichel, H., Koeffler, H. P., Barbers, R., Norman, A. W. 1987. „*Regulation of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Production by Cultured Alveolar Macrophages from Normal Human Donors and from Patients with Pulmonary Sarcoidosis*“. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 65 (6): 1201–1209.
- Rigby, W. F., Waugh, M., Graziano, R. F. 1990. „*Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D3*“. Blood 76 (1): 189–197.
- Rivas-Santiago, B., Hernandez-Pando, R., Carranza, C., Juarez, E. Contreras, J. L., Aguilar-Leon, D., Torres, M., Sada, E. 2008. „*Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells*“. Infection and immunity 76 (3): 935–941.
- Sadeghi, K., Wessner, B. Laggner, U., Ploder, M., Tamandl, D., Friedl, J., Zügel, U. u. a. 2006. „*Vitamin D3 Down-regulates Monocyte TLR Expression and Triggers*



*Hyporesponsiveness to Pathogen-associated Molecular Patterns*“. European journal of immunology 36 (2): 361–370.

Sansonetti, P. J., Phalipon, A., Arondel, J., Thirumalai, K., Banerjee, S., Akira, S., Takeda, K., Zychlinsky, A. 2000. „*Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation*“. Immunity 12 (5): 581–590.

Santanam, N., Sanchez, R., Hendler, S., Parthasarathy, S. 1997. „*Aqueous extracts of cigarette smoke promote the oxidation of low density lipoprotein by peroxidases*“. FEBS letters 414 (3): 549–551.

Schauber, J., Svanholm, C., Termén, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Lühns, H., Gudmundsson, G. H. 2003. „*Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways*“. Gut 52 (5): 735–741.

Schauber, J., Dorschner, R. A., Coda, A. B., Büchau, A. S., Liu, P. T., Kiken, D., Helfrich, Y. R. u. a. 2007. „*Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism*“. The Journal of Clinical Investigation 117 (3): 803–811.

Schauber, J., Gallo, R. L. 2007. „*Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes*“. The Journal of investigative dermatology 127 (3): 510–512.

Schleithoff, S., Zittermann, A., Tenderich, G., Berthold, H. K., Stehle, P., Koerfer, R. 2006. „*Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial*“. The American journal of clinical nutrition 83 (4): 754–759.

Segaert, S. 2008. „*Vitamin D Regulation of Cathelicidin in the Skin: Toward a Renaissance of Vitamin D in Dermatology?*“. The Journal of investigative dermatology 128 (4): 773–775.

Shany, S., Levy, Y., Lahav-Cohen, M. 2001. „*The effects of 1alpha,24(S)-dihydroxyvitamin D(2) analog on cancer cell proliferation and cytokine expression*“. Steroids 66 (3-5): 319–325.

Sørensen, O. E., Follin, P., Johnsen, S. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S. Borregaard, H. 2001. „*Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3*“. Blood. 97 (12): 3951–3959.

- Spittler, A., Oehler, R., Goetzing, P., Holzer, S., Reissner, C. M., Leutmezer, F., Rath, V. u. a. 1997. „*Low Glutamine Concentrations Induce Phenotypical and Functional Differentiation of U937 Myelomonocytic Cells*“. *The Journal of nutrition* 127 (11): 2151–2157.
- Stockley, R. A. 2002. „*Neutrophils and the Pathogenesis of COPD\**“. *Chest* 121 (5 Suppl): 151S–155S.
- Stoffels, K., Overbergh, L., Giuliotti, A., Verlinden, L., Bouillon, R., Mathieu, C. 2006. „*Immune regulation of 25-hydroxyvitamin-D3-1alpha-hydroxylase in human monocytes*“. *Journal of bone and mineral research* 21 (1): 37–47.
- Suda, T., Shinki, T., Kurokawa, K. 1994. „*The mechanisms of regulation of vitamin D metabolism in the kidney*“. *Current opinion in nephrology and hypertension* 3 (1): 59–64.
- Sundar, I. K., Hwang, J-W., Wu, S., Sun, J., Rahman. I. 2011. „*Deletion of vitamin D receptor leads to premature emphysema/COPD by increased matrix metalloproteinases and lymphoid aggregates formation*“. *Biochemical and biophysical research communications* 406 (1): 127–133.
- Sundström, C., Nilsson, K. 1976. „*Establishment and Characterization of a Human Histiocytic Lymphoma Cell Line (U-937)*“. *International journal of cancer* 17 (5): 565–577.
- Suttles, J., Stout, R. D. 2009. „*Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis*“. *Seminars in immunology* 21 (5): 257–264.
- Swami, S., Krishnan, A. V., Feldman, D. 2011. „*Vitamin D metabolism and action in the prostate: Implications for health and disease*“. *Molecular and cellular endocrinology* 347 (1-2): 61-69.
- Takeda, K., Akira, S. 2005. „*Toll-like receptors in innate immunity*“. *International immunology* 17 (1): 1–14.
- Tan, X., Wen, X., Liu, Y. 2008. „*Paricalcitol Inhibits Renal Inflammation by Promoting Vitamin D Receptor–Mediated Sequestration of NF- $\kappa$ B Signaling*“. *Journal of the American Society of Nephrology* 19 (9): 1741–1752.
- Taniguchi, T., Eto, T. A., Shiotsuki, H., Sueta, H., Higashi, S., Iwamura, T., Okuda, K. I., Setoguchi, T. 2001. „*Newly established assay method for 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase revealed much lower Km for 25-hydroxyvitamin D3 than for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3*“. *Journal of bone and mineral research* 16 (1): 57–62.

- Tjabringa, G., Klaus, S., Rabe, R., Hiemstra, P. S. 2005. „*The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung*“. Pulmonary pharmacology & therapeutics 18 (5): 321–327.
- Tomasinsig, L., Zanetti, M. 2005. „*The cathelicidins--structure, function and evolution*“. Current protein & peptide science 6 (1): 23–34.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. „*Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*“. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76 (9): 4350–4354.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N-N., Waring, A. J., Lehrer, R. I. 1998. „*Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils*“. Antimicrobial agents and chemotherapy 42 (9): 2206–2214.
- Urashima, M., Segawa, T., Okazaki, M., Kurihara, M., Wada, Y., Ida, H. 2010. „*Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren*“. The American journal of clinical nutrition 91 (5): 1255-1260.
- Van der Vaart, H., Postma, D. S., Timens, W., Ten Hacken, N. H. T. 2004. „*Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review*“. Thorax 59 (8): 713-721.
- Van der Meer, T. J., Menconi, M. J., Zhuang, J., Wang, H., Murtaugh, R., Bouza, C., Stevens, P., Fink, M. P. 1995. „*Protective effects of a novel 32-amino acid C-terminal fragment of CAP18 in endotoxemic pigs*“. Surgery 117 (6): 656–662.
- Verhoeckx, K., Bijlsma, G. M., de Groene, E. M., Witkamp, R. F., van der Greef, J., Rodenburg, R. J. 2004. „*A combination of proteomics, principal component analysis and transcriptomics is a powerful tool for the identification of biomarkers for macrophage maturation in the U937 cell line*“. Proteomics 4 (4): 1014–1028.
- Vieth, R.. 2006. „*What is the optimal vitamin D status for health?*“. Progress in biophysics and molecular biology 92 (1): 26–32.
- Wang, T-T., Dabbas, B., Laperriere, D., Bitton, A. J., Soualhine, H., Tavera-Mendoza, L. E., Dionne, S. 2010. „*Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease*“. The journal of biological chemistry 285 (4): 2227–2231.
- Wang, X., Wang, T-T., White, J. H., Studzinski, G. P. 2006. „*Induction of kinase suppressor of RAS-1(KSR-1) gene by 1, alpha25-dihydroxyvitamin D3 in human*

*leukemia HL60 cells through a vitamin D response element in the 5'-flanking region*". *Oncogene* 25 (53): 7078–7085.

Wang, X., Wang, T-T., White, J. H., Studzinski, G. P. 2007. „*Expression of human kinase suppressor of Ras 2 (hKSR-2) gene in HL60 leukemia cells is directly upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and is required for optimal cell differentiation*". *Experimental cell research* 313 (14): 3034–3045.

Webb, A. R., Decosta, B. R., Holick, M. F. 1989. „*Sunlight Regulates the Cutaneous Production of Vitamin D3 by Causing Its Photodegradation*". *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 68 (5): 882–887.

Wecksler, W. R., Norman, A. W. 1980. „*A kinetic and equilibrium binding study of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 with its cytosol receptor from chick intestinal mucosa*". *The Journal of biological chemistry* 255 (8): 3571–3574.

Westerhoff, H. V., Juretić, D., Hendler, R. W., Zasloff, M. 1989. „*Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (17): 6597–6601.

Wright, R. 2005. „*Make no bones about it: increasing epidemiologic evidence links vitamin D to pulmonary function and COPD*". *Chest* 128 (6): 3781–3783.

Wu, H., Zhang, G., Minton, J. E., Ross, C., Blecha, F. 2000. „*Regulation of Cathelicidin Gene Expression: Induction by Lipopolysaccharide, Interleukin-6, Retinoic Acid, and Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection*". *Infection and immunity* 68 (10): 5552–5558.

Wuerth, K., Hancock, R. E. 2011. „*New Insights into Cathelicidin Modulation of Adaptive Immunity*". *European journal of immunology* 41 (10): 2817–2819.

Xu, J., Xu, F., Lin, Y. 2011. „*Cigarette smoke synergizes lipopolysaccharide-induced interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion from macrophages via substance P-mediated nuclear factor- $\kappa$ B activation*". *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44 (3): 302–308.

De Yang, V., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., Chertov, O. 2000. „*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*". *The Journal of experimental medicine* 192 (7): 1069–1074.

Yang, S., Chida, A., Bauter, M. R., Shafiq, N., Seweryniak, N., Maggirwar, S., Kilty, S.,

- Rahman, I. 2006. „*Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- $\kappa$ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages*“. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 291 (1): 46–57.
- Yim, S., Dhawan, P., Rangunath, C., Christakos, S., Diamond, G. 2007. „*Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>*“. Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society 6 (6): 403–410.
- Zaiou, M., Nizet, V., Gallo, R. 2003. „*Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence*“. The Journal of investigative dermatology 120 (5): 810–816.
- Zanetti, M., Gennaro, R., Scocchi, M., Skerlavaj, B. 2000. „*Structure and biology of cathelicidins*“. Advances in experimental medicine and biology 479: 203–218.
- Zanetti, M. 2005. „*The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals*“. Current issues in molecular biology 7 (2): 179–196.
- Zanetti, M., Gennaro, R., Romeo, D. 1995. „*Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain*“. FEBS letters 375 (1): 1–5.
- Zasloff, M. 2002. „*Antimicrobial peptides of multicellular organisms*“. Nature 415 (6870): 389–395.
- Zhou, J., Eksioglu, E. A., Fortenbery, N. R., Chen, X., Wang, H., Epling-Burnette, P. K., Djeu, J. Y., Wei. 2011. „*Bone marrow mononuclear cells up-regulate toll-like receptor expression and produce inflammatory mediators in response to cigarette smoke extract*“. PLoS one 6(6): e21173. doi:10.1371/journal.pone.0021173.
- Zhu, J., und Chandra M. 2010. „*Toll-Like Receptor Signaling Pathways—Therapeutic Opportunities*“. Mediators of inflammation 2010: e781235. doi: 10.1155/2010/781235.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Fütterer A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmüller, G. 1988. „*Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*“. International journal of cancer. Journal international du cancer 41 (3): 456–461.
- Zittermann, A. 2003. „*Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence?*“. British journal of nutrition 89: 552–572.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>1,25VitD3</b>	1,25-Dihydroxyvitamin D3, biologische aktive Form
<b>25VitD3</b>	25-Hydroxyvitamin D3, Vorstufe der biologisch aktiven Form
<b>AMP</b>	Antimikrobielles Peptid
<b>APRF</b>	Acute phase response factor, Akutphasenreaktionsfaktor
<b>Aqua bidest.</b>	Zweifach destilliertes Wasser
<b>BMDC</b>	Bone marrow derived cells, Knochenmarkzellen
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin, bovines Serumalbumin
<b>cDNA</b>	Complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>C/EBP</b>	CCAAT/enhancer-bindingprotein, CCAAT/Verstärker-Bindungsprotein
<b>cfu</b>	Colony forming unit, koloniebildende Einheit
<b>COPD</b>	Chronic obstructive pulmonary disease, chronisch obstruktive Lungenerkrankung
<b>CSE</b>	Cigarette smoke extract, Zigarettenrauch-Extrakt
<b>CXCL1/KC</b>	C-X-C motif ligand 1/keratinocyte chemoattractant, C-X-C-Ligand1 /Keratinozyten-Chemokin
<b>CYP</b>	Cytochrom P450
<b>CYP27B1</b>	Cytochrom P450, Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1 auch: 1 $\alpha$ -Hydroxylase
<b>CYP24A1</b>	Cytochrom P450, Familie 24, Subfamilie A, Polypeptid 1 auch: 24-Hydroxylase

---

<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay, Enzym-gekoppelter Immunadsorbtionstest
<b>ER</b>	Endoplasmatischen Retikulum
<b>FCS</b>	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
<b>FPRL-1</b>	Formyl peptide receptor-like 1
<b>GADPH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>hBD2</b>	Humanes $\alpha$ -Defensin 2
<b>hCAP-18</b>	human cationic antimicrobial protein-18, humanes kationisches antimikrobielles Protein-18
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoff, Salzsäure
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Schwefelsäure
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen, humanes Leukozyten-Antigen
<b>HRP</b>	Horse reddish peroxidase, Meerrettichperoxidase
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor $\alpha$ , Inhibitor von NF $\kappa$ B $\alpha$

---

<b>IL</b>	Interleukin
<b>IOM</b>	Institute of Medicine
<b>IRAK Kinase</b>	IL-1 receptor associated kinase, IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
<b>JAK</b>	janus kinase, Januskinase
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	Kaliumhydrogencarbonat
<b>LL-37 Leucine</b>	Antimikrobielles Peptid; 37 Aminosäuren; N-terminal zwei Leucine
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase, Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>mCRAMP</b>	Mouse cathelicidin related antimicrobial peptide, Cathelizidin verwandtes antimikrobielles Peptid der Maus
<b>M-CSF</b>	Macrophage-colony-stimulating-factor, Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
<b>mRNA</b>	Messenger-ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
<b>M-MuLV RT</b>	moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Reverse Transkriptase gewonnen aus dem Molony-Maus-Leukämievirus
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88, Myeloid Differenzierungsfaktor 88
<b>NAA</b>	Nonessential amino acids, Nichtessentielle Aminosäuren
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Natriumcarbonat



---

<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, Nukleärer Faktor $\kappa$ B
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Ammoniumchlorid
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PAMPs</b>	Pathogen-associated molecular patterns, Pathogen-assozierte molekulare Muster
<b>Pam3CSK4</b>	Pam3-Cys-Ser-Lys4 (TLR1/2-Ligand)
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cell, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
<b>POD</b>	Peroxidase
<b>PMA</b>	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<b>PRR</b>	Pattern-recognition receptor, mustererkennender Rezeptor
<b>P/S-Lösung</b>	Penicillin/Streptomycin-Lösung
<b>PTH</b>	Parathormon
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative real time-PCR, quantitative Echtzeit-PCR
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
<b>rRNA</b>	Ribosomal-ribonucleic acid, ribosomale-Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfat, Natriumlaurylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

<b>SOCS</b>	Suppressor of cytokine signaling proteins, Suppressor-Proteine der Zytokin-Signalwege
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription, Signaltransducer und Aktivator der Transkription
<b>TBS</b>	Tris buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung
<b>Th1-Zellen</b>	T-Helfer-Typ1-Zellen
<b>TIR-Domäne</b>	Toll-like-/IL-1-Rezeptor-Domäne
<b>TLR</b>	Toll-like-Rezeptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
<b>TRAM</b>	TRIF-related adapter molecule, TRIF-abhängiges Adaptermolekül
<b>TRIF</b>	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ , TIR-Domäne-enthaltendes Adapter-induzierendes IFN $\beta$
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VDBP</b>	Vitamin-D-bindendes Protein
<b>VDR</b>	Vitamin-D-Rezeptor
<b>VDRE</b>	Vitamin-D-responsive-element, Vitamin D Response-Element
<b>w/v</b>	weight/volume, Gewicht/Volumen

## 9 Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Abbildung 1:</b> Prozessierung, Struktur und Wirkungen des humanen Cathelizidins.....	7
<b>Abbildung 2:</b> Darstellung des Vitamin-D-Metabolismus.....	13
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des Eliminationsassays. Durchführung siehe Kap. 3.2.9.....	44
<b>Abbildung 4:</b> Expression von VDR-mRNA bei humanen Makrophagen nach Stimulation mit einem TLR1/2-Liganden.....	49
<b>Abbildung 5:</b> Expression von hCAP-18-mRNA durch Makrophagen bei verschiedenen Vitamin-D-Konzentrationen .....	51
<b>Abbildung 6 :</b> hCAP-18-mRNA-Expression bei humanen Makrophagen nach Stimulation mit Vitamin D ohne oder mit <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	51
<b>Abbildung 7:</b> hCAP-18-mRNA-Expression bei humanen Makrophagen nach Stimulation mit LPS.....	48
<b>Abbildung 8:</b> Messung der IL-1 $\beta$ -Konzentration mittels ELISA nach Vitamin-D-Stimulation .....	49
<b>Abbildung 9:</b> Messung von TNF- $\alpha$ in Zellüberständen humaner Makrophagen nach Inkubation mit Vitamin D und PAO1.....	54
<b>Abbildung 10:</b> Messung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ in Zellüberständen humaner Makrophagen nach Stimulation mit LPS und Vitamin D. ....	50
<b>Abbildung 11:</b> IL-8-Sekretion humaner Makrophagen nach der Stimulation mit Pam3CSK4 und Vitamin D .....	55
<b>Abbildung 12:</b> Ausschüttung von LL-37 durch neutrophile Granulozyten.....	56
<b>Abbildung 13:</b> IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ -Produktion von neutrophilen Granulozyten nach Vitamin-D-Stimulation.....	57
<b>Abbildung 14:</b> CXCL1/KC-Sekretion muriner Makrophagen nach Stimulation mit Vitamin D. ....	57
<b>Abbildung 15:</b> Expression von hCAP-18 in humanen Zelllinien nach Stimulation mit Vitamin D.....	59
<b>Abbildung 16:</b> Messung proinflammatorischer Zytokine im Überstand nach Stimulation der Zelllinie U937 mit Vitamin D.....	60
<b>Abbildung 17:</b> Eliminationsassay mit humanen Makrophagen und <i>P. aeruginosa</i> .....	61
<b>Abbildung 18:</b> Eliminationsassay mit humanen Makrophagen und <i>Staphylococcus aureus</i> .....	62
<b>Abbildung 19:</b> hCAP-18-mRNA Induktion in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Vitamin D und Pam3CSK4 bzw. <i>P. aeruginosa</i> PAO1 unter dem Einfluss von Zigarettenrauch-Extrakt .....	63
<b>Abbildung 20:</b> Zytokinausschüttung humaner Makrophagen nach Vorbehandlung mit Vitamin D und darauf folgender Stimulation mit CSE bzw. CSE und <i>P. aeruginosa</i> PAO1. ....	64

---

## 10 Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabelle 1: PCR-Bedingungen.....	38
Tabelle 2: Primer.....	39
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für ELISAs.....	42
Tabelle 4: Antikörper für Western-Blots .....	45

---

## 11 Anhang

	<u>Seite</u>
<b>Veröffentlichungen, Kongresse, Poster .....</b>	<b>102</b>
<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>	<b>103</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>104</b>

## Veröffentlichungen, Kongresse, Poster

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

### Veröffentlichungen:

C. Herr, T. Greulich, R. Koczulla, S. Meyer, T. Zakharkina, M. Branscheidt, R. Eschmann and R. Bals (2011). *The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer*. Respiratory Research, 12 (1):31.

T. Greulich, W. Groenewold, M. Branscheidt, C. Herr, R. Koczulla, C. Vogelmeier and R. Bals. *A potential protective role of vitamin D in sepsis*. Aktuell eingereicht bei Critical Care, noch nicht veröffentlicht.

### Kongressbeiträge:

M. Branscheidt, C. Herr, S. Al-Alwani, C. Vogelmeier, R. Bals: *Vitamin D moduliert die angeborene Immunreaktion von Monozyten/Makrophagen*. Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., 7./8. November 2008, Freiburg.

M. Branscheidt: *Vitamin D modulates the innate immune response of neutrophils and macrophages*. 9<sup>th</sup> Symposium of Research projects by the Mukoviszidose e.V., 24./25. September 2009, Schloss Mickeln, Düsseldorf.

### Poster:

C. Herr, M. Branscheidt, C. Vogelmeier, R. Bals: *Influence of Vitamin D on the innate immune response in cigarette smoke exposed macrophages*. The 20<sup>th</sup> European Respiratory Society Congress, September 18-22, 2010, Barcelona, Spain. Thematic Poster Session.

---

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Albert, Al-Fakhri, Arnold, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum,

Baumann, Behr, Beyer, Bien, Bolm, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Dietrich, Dinges,

Donner-Banzhoff, Dünne, Duda, Feiber, Feuser, Funck, Gerdes, Geyer, Görg C.,

Görg K., Grau, Gress, Grimm, Gudermann, Happle, Hassan, Henzel,

Hermann-Lingen, Hertl, Jungclas, Kann, Kalder, Keller, Kill, Klose, Koch, Koczulla,

König, Koolmann, Krause, Krieg, Kroll, Kühnert, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Lübbe,

Maisch, Max, Moosdorf, Moll, Mueller, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Remschmidt,

Renz, Richter, Röhm, Roelke, Röper, Rothmund, Ruchholz, Rudolph, Schade,

Schäfer, Schnabel, Schrader, Schulze, Seitz, Seyberth, Seyfarth, Steiniger, Stempel,

Sundermeyer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals für die Bereitstellung des Themas und für seine Betreuung und Unterstützung während der Arbeit zu dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. C. Herr für seine Betreuung und den daraus resultierenden Ratschlägen und Hilfestellungen bei Problemfällen, für sein Engagement, die vielen wertvollen Hinweise und seine Geduld.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen und Kolleginnen der AG Bals, Sadek Al-Alwani, Thomas Damm, Sarah Noeske, Olaf Pinkenburg, Annette Püchner und Tetjana Zakharkina für die stets kollegiale Atmosphäre und ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Akira Hattesoht bedanken, für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die angenehme Atmosphäre in unserem Büro und die daraus erwachsene Freundschaft.

Meinen Eltern danke ich aus tiefstem Herzen für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.