

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression krankheitsassoziiertes und therapierelevanter Enzyme und Proteine im Dickdarmgewebe von Patienten mit sporadischen und hereditären kolorektalen Tumoren sowie CED in Abhängigkeit vom jeweiligen Grad der Entdifferenzierung bzw. Entzündung zu untersuchen. In einem weiteren Schritt sollte der präventivmedizinische und therapeutische Effekt einer butyrogenen RS III auf die kolorektale Karzinogenese am 1,2-DMH-induzierten Tumormodell und auf entzündliche Darmerkrankungen am TNBS-induzierten Kolutismodell in der Ratte überprüft werden. Um die Relevanz dieser Tiermodelle sowie die Übertragbarkeit der Ergebnisse eines postulierten RS-vermittelten Effekts auf den Menschen einschätzen zu können, wurden vergleichende histologische und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, um Veränderungen in einzelnen Zelltypen, Zell-Kompartimenten und Gewebeschichten sicher beurteilen zu können.

5.1 Kolorektale Karzinogenese

5.1.1 Humane Gewebeproben – Graduierung und immunhistochemische Untersuchungen

Vorkommen und Verteilung verschiedener tumor- und entzündungsassoziiertes Proteine wurden in morphologisch intaktem Dickdarmgewebe und im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese, d. h. abhängig vom Grad der Entdifferenzierung, vergleichend untersucht, um Aussagen über die Bedeutung der Parameter in der jeweiligen Phase der Tumorentstehung machen zu können. Es wurden Proben von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren und mit FAP beurteilt.

Um eine einheitliche Grundlage für die Evaluierung der Proteinmuster in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad zu schaffen, wurden die Proben nach ihrem histomorphologischen Erscheinungsbild klassifiziert und unabhängig von der Stadieneinteilung nach TNM-Klassifikation oder Dukes den Entdifferenzierungsgraden G1 bis G4 zugeordnet. Bei den untersuchten Proben handelte es sich sowohl bei den sporadischen als auch bei den FAP-Tumoren zum überwiegenden Teil um tubuläre und tubulovillöse Tumore. Dadurch war eine direkte Vergleichbarkeit gewährleistet. Vorteilhaft war die Einbeziehung von FAP-Patienten in die Studie, da dies eine Analyse früher hyper- und dysplastischer Veränderungen der Darmschleimhaut erlaubte und geprüft werden konnte, ob generelle Unterschiede im Expressionsmuster von krankheitsrelevanten Proteinen und ihrem zeitlichen Auftreten während der kolorektalen Karzinogenese existieren, wenn entweder hereditäre oder sporadische primäre Mutationen zugrunde liegen. Bei den FAP-Proben wurden nur Tumore mit den Differenzierungsgraden G1 bis G3 klassifiziert, was die Tatsache widerspiegelt, dass

es sich bei den untersuchten Proben überwiegend um Adenome, seltener um Adenokarzinome handelte. Zur Untersuchung der Proteinexpression im Normalbefund diente Gewebe aus morphologisch unauffälligen Arealen von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren in ausreichender Entfernung vom Tumor. Es wurden jeweils mehrere Proben von einem Patienten untersucht, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten.

In dem für die Auswertung der immunhistochemischen Befunde erarbeiteten semiquantitativen Score wurde nicht nur die Häufung positiver Zellen und die Intensität der Immunfärbung sondern auch die Lage der positiven Zellen im Gewebe und die subzelluläre Lokalisation der IR berücksichtigt. Er wurde so konzipiert, dass eine Vielzahl von Proteinen mit sehr unterschiedlichen Expressionsmustern vergleichend untersucht werden konnten. Prinzipiell hat sich der Score bewährt. Für Untersuchungen an Rattengewebe sollte das Ranking für die IR im Epithel für schwach exprimierte Proteine überarbeitet werden, da sonst die Unterschiede bezüglich der IR im Score nicht zum Ausdruck kommen. Vorteil des Scores war es, dass Unterschiede in den Epithelzellen entlang der Kryptenachse verfolgt werden konnten und entsprechend dem Achsen-Funktions-Verlauf Rückschlüsse auf funktionelle Zusammenhänge abgeleitet werden konnten.

Die Nutzung des DIC bei der mikroskopischen Auswertung ermöglichte es, auch ohne Gegenfärbung des Gewebes, die Gewebestruktur im Mikroskop sichtbar zu machen. Dadurch wurden Farbüberlagerungen ausgeschlossen und die Detektion feinsten Immunfärbungen möglich.

In Abbildung 5-1 wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen für die IR im Epithel von morphologisch intaktem Gewebe und von sporadischem kolorektalen Tumorgewebe zusammenfassend schematisch dargestellt. Dabei repräsentieren die Werte für morphologisch intaktes Epithel sowie Tumorepithel der Grade G1 und G2 Mittelwerte über die Mediane der vier Kryptenviertel. Für die Grade G3 und G4 wurde der direkt ermittelte Medianwert aufgetragen. Es ist ersichtlich, dass die Enzyme COX-2, nachgewiesen mit dem polyclonalen Antikörper (COX-2 pc), die iNOS und die GI-GPx IR im Epithel des morphologisch intakten Gewebes exprimiert werden und sich ihr Spiegel bereits in frühen Entdifferenzierungsstadien deutlich verstärkt. Herauszustellen ist, dass sowohl die zeitliche Abfolge der Veränderungen, als auch die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der drei Proteine weitestgehend übereinstimmen. Im Gegensatz dazu minimieren sich mit zunehmender Entdifferenzierung die schwachen Spiegel der COX-1, der COX-2 mc (Nachweis mittels monoclonalem Antikörper), und der 15-LOX-2 im Epithel. Die 15-LOX-1 tritt im Epithel nicht auf.

Wechselwirkungen zwischen Epithel und unterliegendem Bindegewebe leiten sich aus der Aktivität der fixen und mobilen Stromazellen ab. Sie sind durch immunhistochemische

Methoden, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurden, im Detail erfassbar. Bei der Analyse von Immunblots an homogenisierten Geweben oder Zellkulturen gehen viele Informationen verloren oder führen möglicherweise auch zu falschen Schlussfolgerungen.

Die Prozesse in den Zellen der Lamina propria unterscheiden sich teilweise von denen im Epithel (Abb. 5-2). Die COX-2 (pc, mc) und die iNOS liegen in diesen Zellen im Tumorgewebe in höheren Konzentrationen vor als im Normalbefund. Leicht erhöht ist auch die COX-1. Zusätzlich werden die 15-LOX-1 und -2 verstärkt im Verlauf der Karzinogenese exprimiert. Beide 15-LOX-Isoenzyme spielen in den Stromazellen eine wesentlichere Rolle als im Epithel. Im Gegensatz dazu tritt die GI-GPx in diesen Zellen in intaktem Gewebe nicht auf und im Verlauf der Entdifferenzierung verändert sich die Expression nur geringfügig.

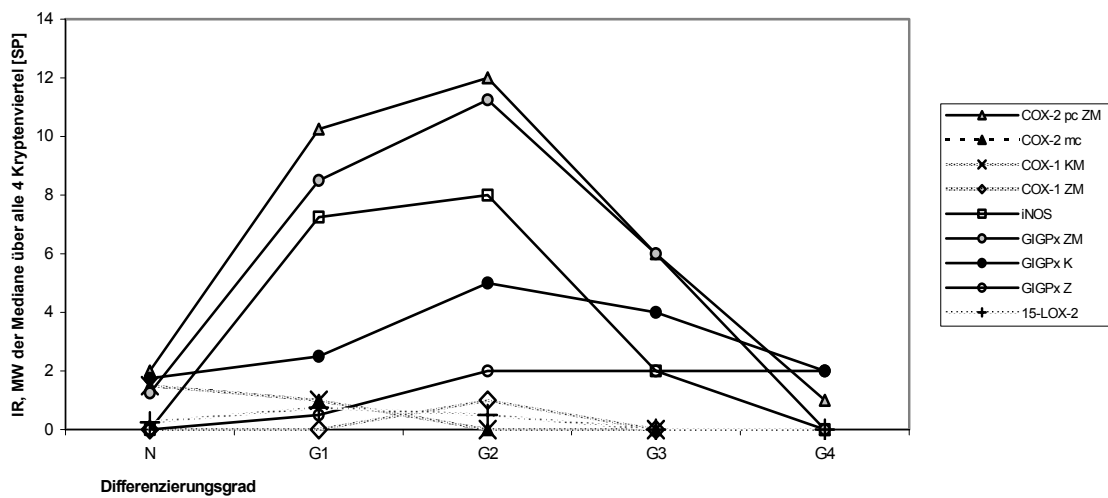


Abb. 5-1: Schematische Darstellung des Verhaltens der COX-1, COX-2 (pc, mc), iNOS, GI-GPx und 15-LOX-2 IR in Abhängigkeit vom Grad der Differenzierung; Kolorektum, human; Lamina epithelialis; morphologisch intaktes Gewebe, sporadische kolorektale Tumore

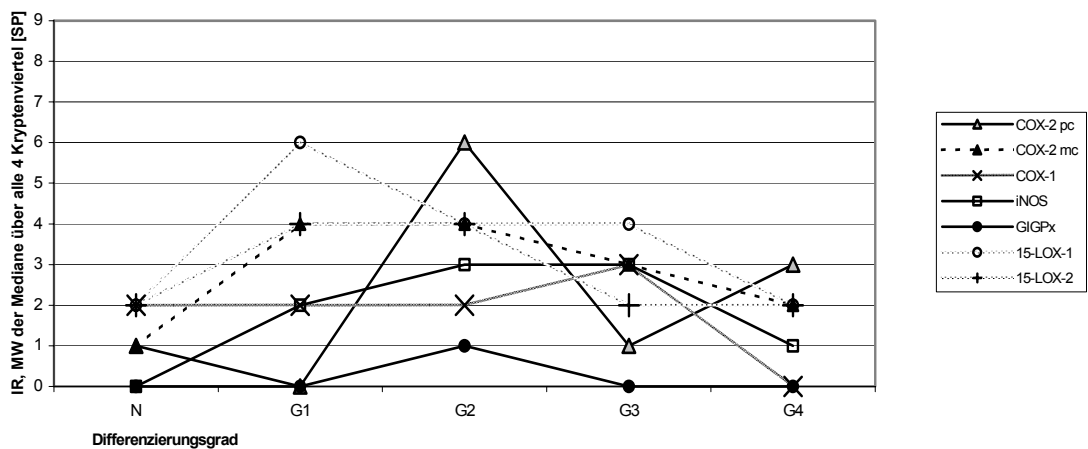


Abb. 5-2: Schematische Darstellung des Verhaltens der COX-1, COX-2 (pc, mc), iNOS, GI-GPx, 15-LOX-1 und 15-LOX-2 IR in Abhängigkeit vom Grad der Differenzierung; Kolorektum, human; Lamina propria; morphologisch intaktes Gewebe, sporadische kolorektale Tumore

Vergleicht man das Verhalten der einzelnen Enzyme im Epithel von FAP- und sporadischen kolorektalen Tumorproben, so fällt auf, dass sich verschiedene Veränderungen bei FAP zeitiger manifestieren und im späteren Verlauf (G1-G3) weniger stark ausgeprägt sind (Abb. 5-3).

Zu den ersten Veränderungen zählt bei apc-Gen-Defekträgern offensichtlich eine Erhöhung der COX-2 pc-, iNOS-, GI-GPx- und in geringerem Maße der COX-1-Spiegel im Epithel. Dieser Effekt tritt auf, noch bevor neoplastische Veränderungen histologisch erkennbar sind. In frühen Hyperplasien der Schleimhaut verstärken sich die Spiegel dieser drei Enzyme weiter. Zusätzlich tritt eine verstärkte Expression von 15-LOX-2 im Epithel in frühen Entdifferenzierungsstadien auf.

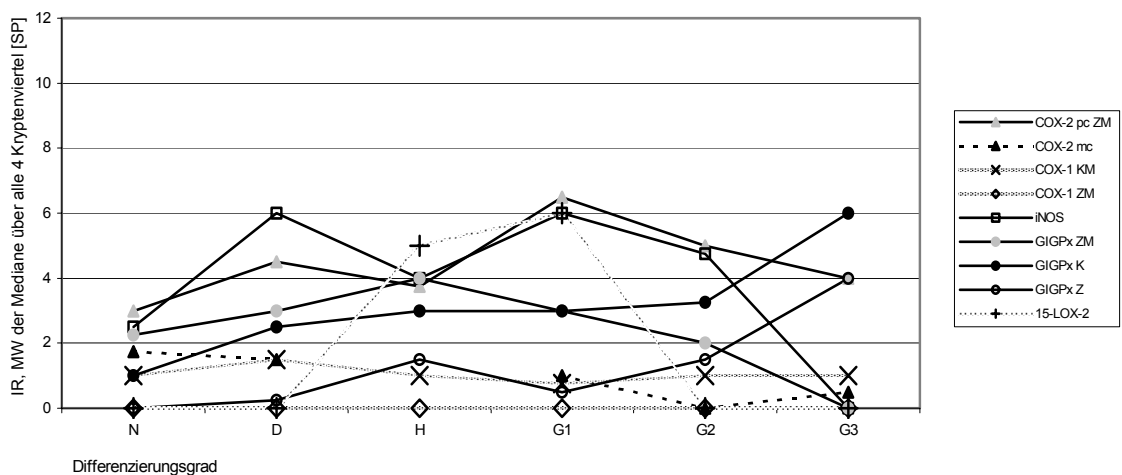


Abb. 5-3: Schematische Darstellung des Verhaltens der COX-1, COX-2 (pc, mc), iNOS, GI-GPx und 15-LOX-2 IR in Abhängigkeit vom Grad der Differenzierung, FAP; Rektosigmoid, Lamina epithelialis

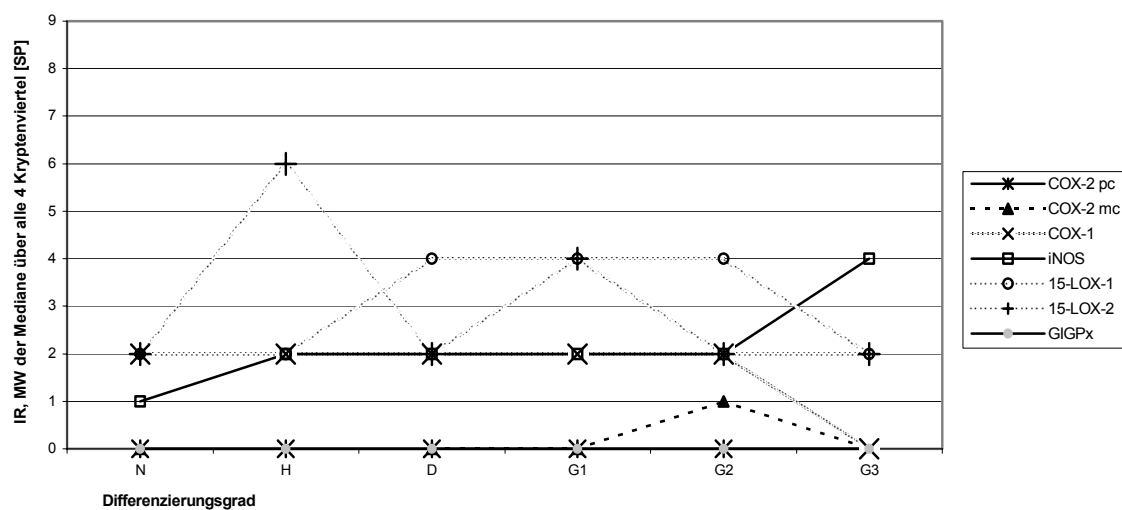


Abb. 5-4: Schematische Darstellung des Verhaltens der COX-1, COX-2 (pc, mc), iNOS, GI-GPx, 15-LOX-1 und 15-LOX-2 IR in Abhängigkeit vom Grad der Differenzierung, FAP; Rektosigmoid, Lamina propria

Ähnlich wie in den Epithelzellen ab Differenzierungsgrad G1/G2 waren bei FAP-Patienten auch die Veränderungen der Enzymmuster in den Stromazellen schwächer ausgeprägt. Nur die beiden 15-LOX-Isoenzyme und die iNOS erreichten vergleichbare Spiegel wie in den Stromazellen bei sporadischen Tumoren.

Die Ursachen für die weniger stark ausgeprägten Enzym Spiegel von G1 nach G3 bei der FAP im Vergleich zu sporadischen Tumoren könnten darin liegen, dass es sich bei den analysierten Tumoren zum größten Teil um Adenome und nicht, wie bei den sporadischen Tumoren, um Adenokarzinome handelte. Die hier herausgestellten Unterschiede in der Verteilung prooxidativ und antioxidativ wirkender Enzyme spiegeln sich aber auch im Verhalten von Enzymen wider, die an der Signalübertragung beteiligt sind und dem NF- κ B-Transkriptionssystem. Marinović (2003) konnte im Rahmen dieser Studie zeigen, dass sich die PKC- α und PKC- δ sowie NF- κ B analog zur COX-2 pc, iNOS und GI-GPx verhalten. Diese Befunde sind als erste Hinweise zur stadienabhängigen Co-Expression dieser Proteine zu werten.

5.1.1.1 COX

Zahlreiche Literaturangaben belegen, dass die kolorektale Karzinogenese mit einer verstärkten Expression der COX-2 einhergeht (Eberhart et al., 1994; Sano et al., 1995). Untersuchungen an COX-2 Knockout-Modellen zeigen, dass eine Eliminierung der COX-2-Expression und -Aktivität die Tumorentwicklung im Dickdarm vermindert (Oshima et al., 1996). Die Rolle dieses Enzyms in der Progression der kolorektalen Karzinogenese ist von besonderem Interesse, da die COX-2 ein bekanntes Ziel von NSAIDs ist und diese Inhibitoren in der Lage sind, das Risiko für kolorektale Tumore zu reduzieren (Thun et al., 2002). Die Mechanismen, über welche die Prostaglandine die Tumorprogression fördern, sind bisher nur unvollständig aufgeklärt (Tsuji et al., 2001; Turini und DuBois, 2002). Für weitere Aussagen über die Wirkmechanismen des Enzyms und Vorschläge für therapeutische Strategien ist es notwendig, die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der COX-2 in gesundem und pathologisch verändertem Gewebe sowie den Zeitpunkt der Hochregulation des Enzyms unter pathologischen Bedingungen zu kennen. Entsprechende Angaben werden in der Literatur kontrovers diskutiert. COX-1 und COX-2 teilen 60-65 % Sequenzidentität und sind sehr homolog in der Aminosäuresequenz. Hauptsequenzunterschiede zwischen den beiden Isoformen befinden sich in der Membranbindungsdomäne und in der Insertion in der C-terminalen Region (Smith et al., 2000). Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an seriellen Schnitten mehrere polyclonale und monoclonale COX-2 spezifische Antikörper eingesetzt. Ergebnisse von jeweils einem monoclonalen und einem polyclonalen Antikörper, die beide gegen das C-terminale Ende des Enzyms generiert wurden, sind in dieser Arbeit ausgewiesen. Die

COX-2 wurde mit beiden Antikörpern in morphologisch intakter Mukosa nachgewiesen, wobei sich die reaktiven Zelltypen unterschieden. Die Reaktivität mit dem polyclonalen Antikörper beschränkte sich hauptsächlich auf das Saumepithel. Selten waren Stromazellen positiv. Mit dem monoclonalen Antikörper färbten sich hauptsächlich mobile und fixe Stromazellen, selten Epithelzellen in den unteren Kryptenvierteln sowie Endothelzellen. Zellen der Muskelschichten waren stark immunreaktiv.

Die Befunde, die mit dem polyclonalen Antikörper in intakter Mukosa erhoben wurden, stimmen mit Literaturangaben überein (Shao et al., 1999; Khan et al., 2001; Garewal et al., 2003). Müller-Decker et al. (1999) fanden dagegen nur eine sehr geringe COX-2 IR in nicht-neoplastischen Saumzellen, jedoch in gleicher Lokalisation, apikal vom Zellkern, COX-1 reaktives Protein.

Auch die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem monoclonalen Antikörper entsprechen jüngsten Literaturangaben (Masferrer et al., 2000; Garewal et al., 2003). Eberhart et al. (1994); Sano et al., (1995) und Chapple et al. (2000) fanden hingegen keine COX-2-Expression in histologisch normaler Mukosa.

Da sich der Nachweis in normaler Mukosa, die zelluläre Lokalisation und z. T. auch die subzelluläre Anordnung der COX-2 bei Anwendung von verschiedenen Isoenzym-spezifischen Antikörpern unterscheidet, ist die Existenz von weiteren COX-2 ähnlichen Isoenzymen wahrscheinlich.

Die Lokalisation der induzierbaren COX-2 in den verschiedenen Zelltypen innerhalb morphologisch intakter Gewebe deutet auf eine konstitutive Expression und damit physiologische Funktion des Enzyms hin. Für die positiven Saumzellen könnte dies am ehesten im Zusammenhang mit der Apoptose und in Bezug auf Wechselwirkungen zwischen Epithel und dem luminalen Darminhalt diskutiert werden. Auf eine Relevanz für die Barrierefunktion weisen stärker COX-2 positive Zellen in der Lamina epithelialis in direkter Nachbarschaft von Lymphfollikeln hin.

Wie schon einleitend beschrieben, ist die COX-2 bereits in morphologisch intaktem Gewebe von FAP-Patienten, besonders im Saumepithel und z. T. auch in den Epithelzellen am Kryptengrund, erhöht. Dies kann als Indiz verstanden werden, dass schon die Heterozygotie des *apc*-Gens mit einem höheren COX-2-Spiegel in Epithelzellen einhergeht. Diese Erhöhung tritt ein, noch bevor sich neoplastische Veränderungen erkennen lassen. Auch frühe hyperplastische und dysplastische Veränderungen weisen über die gesamte Kryptenachse verstärkt COX-2 auf. Aus einer Überexpression von COX-2 resultiert ein Verlust der Apoptoseaktivität (Tsuji und DuBois, 1995). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass APC direkt oder indirekt die COX-2-Expression reguliert (Hsi et al., 1999; Araki et al., 2003). In APC-defekten, COX-2 exprimierenden HT-29 Zellen bleiben nach Expression des intakten APC-Proteins die COX-2 mRNA-Spiegel konstant; es erfolgt jedoch eine zeitabhängige

Abnahme der Expression von COX-2 Protein. Dies geht mit einer Induktion der Apoptose einher. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die Verteilung von PKC- α auf zellulärer und subzellulärer Ebene und die von NF- κ B auf zellulärer Ebene mit der Verteilung der COX-2 in den einzelnen Differenzierungsstadien korreliert (Marinović, 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Induktion von COX-2 durch PKC- α über NF- κ B katalysiert wird (Huang et al., 2003).

Die COX-2 Hochregulation in den Epithelzellen morphologisch intakter Mukosa bei Patienten mit FAP ist somit ein Zeichen der frühen onkogenen Wirkung, noch vor Einsetzen der Polypenbildung.

Betrachtet man die COX-2 IR im weiteren Verlauf des Entdifferenzierungsprozesses, so ist mit beiden Antikörpern eine signifikant verstärkte IR in den Stromazellen ab G2, jedoch nur mit dem polyclonalen Antikörper eine signifikant verstärkte IR im neoplastischen Epithel ab Differenzierungsgrad G1 nachweisbar. In stark entdifferenzierten Tumorarealen nimmt der COX-2-Spiegel sowohl im Epithel als auch im Stroma wieder ab.

Sowohl für eine Erhöhung der COX-2 in Tumorepithel und -stroma (Müller-Decker et al., 1999; Khan et al., 2001; Garewal et al., 2003) als auch für eine überwiegende Erhöhung im Epithel (Shao et al., 1999) sowie eine vorwiegende Expression im Tumorstroma (Chapple et al., 2000; Chapple et al., 2002) finden sich identische Daten in der Literatur. Unterschiedlich sind z. T. die Angaben hinsichtlich der subzellulären Verteilung. Chapple et al. (2002) konnten zeigen, dass die COX-2 exprimierenden Stromazellen in Gebieten mit hoher Kapillar-Dichte aggregieren. Sonoshita et al. (2002) analysierten die COX-2 positiven Zellen an der Oberfläche des Tumorstromas von FAP-Polypen und Darmpolypen von *Apc* ^{Δ 716}-Mäusen und stellten fest, dass es sich dabei hauptsächlich um aktivierte Fibroblasten und seltener um Endothelzellen, Makrophagen und Myofibroblasten handelt. Sie postulierten, dass die COX-2 exprimierenden Fibroblasten und Endothelzellen im Randsaum des Tumorstromas eine wichtige Rolle bei der Tumorexpansion und in der Angiogenese spielen.

Die zelluläre Verteilung der COX-2 in den einzelnen Entdifferenzierungsgraden bei FAP-Proben entsprach weitgehend der in sporadischen kolorektalen Tumoren. Die COX-2-Spiegel im Tumorstroma waren bei FAP jedoch in allen Stadien geringer.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass die verstärkte COX-2-Expression ein sehr frühes Ereignis im Verlauf der Entdifferenzierung darstellt und im Epithel früher einsetzt als in den Stromazellen. Dabei treten starke interindividuelle Abweichungen in den COX-2-Spiegeln in den Epithel- und Stromazellen, sowohl bei FAP- als auch bei sporadischen Tumoren, auf. Insgesamt konnte aber eine gute Übereinstimmung der COX-2-Spiegel mit dem histologischen Grading festgestellt werden.

Die COX-1 IR entsprach auf zellulärer und subzellulärer Ebene dem COX-2-Muster, das mit dem monoclonalen COX-2-Antikörper erhalten wurde. In nicht-neoplastischer Mukosa waren nur wenige Epithelzellen, mobile und fixe Stromazellen sowie Endothelzellen COX-1 immunreaktiv. Dies wurde auch von Shao et al. (1999) beschrieben. Die höchsten COX-1-Spiegel wurden jedoch in den unter der Mukosa liegenden Darmschichten detektiert. In neoplastischen Arealen unterschieden sich die COX-1-Spiegel in den Krypten nicht wesentlich von denen in nicht-neoplastischem Gewebe. Die wenigen perinukleär COX-1 positiven Kryptenzellen verloren sich mit zunehmender Entdifferenzierung. Dagegen waren ab G1 in einigen Proben zusätzlich COX-1 positive Strukturen im Epithel apikal vom Zellkern nachweisbar. Auch im Randbereich des Tumorstromas war ein Anstieg der COX-1-Spiegel mit zunehmender Entdifferenzierung zu verzeichnen. Diese Befunde belegen, dass sich, im Gegensatz zu älteren Auffassungen, auch die COX-1-Muster während der Entdifferenzierung verändern. Es ist von Interesse, dass auch die selektive Hemmung von COX-1 die Bildung von ACFs im AOM-Tumormodell der Ratte und die von intestinalen Polypen in APC-knockout-Mäusen unterdrücken kann (Kitamura et al., 2002). Die Expression von COX-1 in Hela-Zellen resultiert in der Induktion der COX-2 (Sales et al., 2002). Dies lässt vermuten, dass beide Isoenzyme, entweder unabhängig oder in Wechselwirkung, in die Entstehung von intestinalen Polypen involviert sind.

Die Widersprüche zur COX-Expression im Darmgewebe, die sich auch in der Literatur widerspiegeln, lassen sich nicht durch Unterschiede im Untersuchungsgut oder in der angewandten Methodik erklären, sondern vorrangig durch die Verwendung Isoform-spezifischer Antikörper. Die in dieser Arbeit beschriebene subzelluläre Lokalisation der COX-Isoenzyme im endoplasmatischen Retikulum bzw. an perinukleären Membranen, die mit allen drei Antikörpern festgestellt wurde, weist auf eine COX-spezifische Reaktion hin. Die eigenen Befunde, ebenso wie die Ergebnisse aus der Literatur, sprechen dafür, dass noch weitere COX-Isoenzyme im Darm existieren. Schon Willoughby et al. (2000) postulierten die Existenz einer antiinflammatorischen COX-3. Für den humanen cerebralen Cortex wurde kürzlich die Existenz einer COX-3 und auch von zwei kleineren COX-1 abgeleiteten Proteinen (partial COX-1 oder PCOX-1 Proteine, PCOX-1a und PCOX-1b) beschrieben (Chandrasekharan et al., 2002). Die COX-3 wird reichlich exprimiert, vor allem im humanen cerebralen Cortex und im Herz. Das Enzym teilt die katalytischen und wichtige strukturelle Merkmale mit COX-1 und COX-2 und ist hochsensitiv gegenüber Acetaminophen und entsprechenden Verbindungen. Kommerziell erhältliche Antikörper unterscheiden nicht zwischen COX-1 und COX-3 (Schwab et al., 2003a).

Warner und Mitchell (2002) postulieren die Existenz von zwei konstitutiven Proteinen, die sich vom COX-1-Gen ableiten (COX-1 und COX-3) und von drei Proteinen, die sich vom COX-2 Gen ableiten (induzierbare COX-2b, konstitutive COX-2 und induzierbare COX-2).

Die Bedeutung der einzelnen COX-Isoenzyme und deren Funktion in physiologischen und pathologischen Prozessen bedarf der weiteren Aufklärung. Der onkogene Effekt einer erhöhten Prostaglandinsynthese wurde bisher hauptsächlich auf die Aktivität der COX-2 zurückgeführt. Es ist jedoch zu vermuten, dass das Wechselspiel zwischen den COX-Isoformen komplexer ist, als bisher angenommen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen weisen auf subtile Unterschiede im Verteilungsmuster der bekannten Cyclooxygenasen hin. Differenzierende Untersuchungen bezüglich der neu beschriebenen Isoformen lassen weitere Erkenntnisse zu spezifischen Funktionen erwarten.

5.1.1.2 NOS

Hohe Konzentrationen von NO verursachen DNA-Schäden und Apoptose in verschiedenen Zelltypen. Eine weitere Rolle für NO in der Tumorenstehung wird diskutiert, da es auch als angiogener Faktor fungiert (Jaiswal et al., 2001). Es ist bekannt, dass die iNOS sowohl während der kolorektalen Karzinogenese als auch bei CED exprimiert wird. Widersprüchlich sind jedoch Daten bezüglich der Expression unter physiologischen Bedingungen und des Zeitpunktes einer verstärkten Expression bei pathologischen Prozessen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass iNOS nicht nur im Verlauf der Entdifferenzierung exprimiert wird, sondern auch in morphologisch intaktem Gewebe, fokal im Saumepithel der Mukosa und in einzelnen mobilen Stromazellen. Diese Befunde konnten mit einem zweiten spezifischen iNOS-Antikörper abgesichert werden (Daten nicht gezeigt). Eine ähnliche zelluläre und subzelluläre Lokalisation wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Ropponen et al., 2000; Roberts et al., 2001b; Perner et al., 2002). Letztere konnten außerdem zeigen, dass die iNOS-Expression keine Folge der Darmvorbereitung zur Gewebeentnahme ist. Hao et al. (2001) wiesen das Enzym zusätzlich in Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach. Einige Autoren fanden dagegen keine iNOS in normalem Dickdarmgewebe (Hofseth et al., 2003). Der sichere Nachweis von geringen iNOS-Konzentrationen im luminalen Saumepithel lässt eine Funktion bei der Abwehr der Mukosa gegenüber toxischen Effekten aus dem Darmlumen vermuten. Dies wird auch durch den Befund gestützt, dass nur der Verlust der iNOS, nicht aber der anderen beiden NOS-Isoformen zu einem Zusammenbruch der Immunfunktion führt (Tamir und Tannenbaum, 1996).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen weiterhin eine signifikant verstärkte iNOS-Expression sowohl im Tumorepithel als auch in den mobilen tumorinfiltrierenden Zellen in gut differenzierten Arealen sowie eine nachfolgende Abnahme in schlecht differenzierten und undifferenzierten Bereichen. Dies lässt auf eine Rolle der iNOS in den frühesten Stadien der Karzinogenese und während der weiteren Tumorprogression schließen. Eine Expression von iNOS in Blutgefäßen wurde hier im Gegensatz zu Ropponen et al. (2000) nicht gefunden.

Die Autoren schlussfolgerten aus einer inversen Korrelation der iNOS-Konzentration zum Tumorgrad, dass die Überlebensrate der Patienten um so geringer ist, je niedriger die iNOS-Expression ist. Daraus würde sich eine protektive Rolle der iNOS in der Karzinogenese ableiten. Eine gegensätzliche Auffassung vertreten Nozoe et al. (2002). Sie beschrieben eine positive Korrelation zwischen der iNOS-Expression und der Metastasierung. Hao et al. (2001) fanden eine iNOS IR in Karzinomen, konnten aber keine Abhängigkeit vom Entdifferenzierungsgrad nachweisen. Möglicherweise sind diese gegensätzlichen Aussagen darauf zurückzuführen, dass sich, wie in dieser Arbeit ausgewiesen, frühe und späte Stadien der Entdifferenzierung stark in ihrer iNOS-Expression unterscheiden und auch große interindividuelle Abweichungen zwischen einzelnen Tumorproben auftreten können.

In morphologisch intakten Proben von FAP-Patienten lag die iNOS bereits verstärkt im Saumepithel vor. Dabei korrelierte die zelluläre und subzelluläre Lokalisation mit der der COX-2 pc. Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Enzymen, die wahrscheinlich den Prozess der Entdifferenzierung maßgeblich beeinflussen, sind in der Literatur beschrieben (Kobayashi et al., 2001; Liu et al., 2003). Eine weitere Zunahme der iNOS-Konzentration war in hyperproliferativen und dysplastischen Läsionen sowie G1 und G2 nachweisbar. In den Stromazellen lag das Enzym in intaktem Gewebe ebenfalls leicht verstärkt vor, die Hochregulation war aber im weiteren Verlauf der Entdifferenzierung weniger stark ausgeprägt als bei den sporadischen Tumoren. Das Enzym ist im endoplasmatischen Retikulum des Epithels auch katalytisch aktiv. Darauf weisen weitere Befunde hin, die zeigen, dass Nitrotyrosin in einer ähnlichen zellulären und subzellulären Verteilung wie die iNOS vorliegt (Daten nicht gezeigt). Die Nitrierung von Tyrosin zum 3-Nitrotyrosin stellt eine Markerreaktion für *in vivo* entstandenes Peroxynitrit dar. Protein-gebundenes 3-Nitrotyrosin ist bei vielen Erkrankungen nachweisbar (Reiter et al., 2000).

Die Rolle von NO in der kolorektalen Karzinogenese ist wahrscheinlich von der lokalen Konzentration des Moleküls abhängig. So fördert NO in hohen Konzentrationen die Apoptose, während es in geringen Konzentrationen das Tumorstadium begünstigt (Jenkins et al., 1995). NO kann post-translational verschiedene zelluläre Proteine modifizieren, inklusive p53, Caspasen und DNA-Reparaturenzyme (Jaiswal et al., 2000; Chazotte-Aubert et al., 2000) und die Invasivität von HT-29 Zellen steigern (Siegert et al., 2002). Aus einer selektiven Hemmung der iNOS im AOM-Tumormodell resultiert eine verminderte Bildung von ACFs und Hemmung der iNOS- und COX-Aktivität in der Kolonmukosa (Rao et al., 1999).

Es wurde aber auch über antineoplastische Eigenschaften des Enzyms im Mausmodell der FAP berichtet. So entwickelten $Apc^{Min/+} iNOS^{-/-}$ -Mäuse signifikant mehr intestinale Adenome als $Apc^{Min/+} iNOS^{+/+}$ -Mäuse (Scott et al., 2001). Alle Befunde lassen auf eine bedeutende regulatorische Rolle der iNOS in der Tumorgenese schließen.

5.1.1.3 *GI-GPx*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals das Vorkommen und die Verteilung der *GI-GPx* in morphologisch intaktem Dickdarmgewebe des Menschen und bei Entdifferenzierungsprozessen beschrieben (Florian et al., 2001). Das Enzym wird in morphologisch intakter kolorektaler Mukosa sowohl in den Epithelzellen am Kryptengrund als auch im Saumepithel exprimiert, wobei sich die subzelluläre Lokalisation im Verlauf der Differenzierung ändert. Komatsu et al. (2001) beschrieben ebenfalls eine IR am Kryptengrund in der Kolonmukosa; die kernständige IR war stärker ausgeprägt als die zytoplasmatische. Dagegen fanden sie das Enzym nicht im Saumepithel. Die sehr spezifische Verteilung der *GI-GPx* innerhalb der Krypte mit einer hauptsächlich kernständigen Lokalisation im proliferierenden Kompartiment und einer an zytoplasmatische Strukturen apikal vom Zellkern gebundenen Lokalisation im Saumepithel, lassen auf verschiedene Funktionen schließen, die Prozesse der Proliferation sowie der Differenzierung und/oder Apoptose betreffen. Bisher wurde vermutet, dass das Enzym eine Barriere für luminale Hydroperoxide im Saumepithel der Mukosa bildet (Chu et al., 1993; Wingler et al., 2000). Dem widerspricht, dass, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, das Enzym im Saumepithel mehr oder weniger fokal gehäuft und mit großen Abweichungen auftritt. Dieser Befund lässt auf eine spezifische Reaktion auf lokale Prozesse schließen. Ein weiteres Argument für eine Funktion abseits der Barriere ist, dass das Enzym - in seiner strukturgebundenen, apikal vom Zellkern gelegenen Lokalisation - in neoplastischen Zellen entlang der gesamten Kryptenachse nachweisbar ist. Außerdem wird die *GI-GPx* konstant in den Zellkernen am Kryptengrund exprimiert, was auf eine Rolle bei der Zellproliferation hinweist. Das Enzym könnte die im Kryptengrund gelegenen Stammzellen vor oxidativen DNA-Schäden und Mutationen schützen.

In morphologisch intakten Schleimhautproben von FAP-Patienten liegt das Enzym, ähnlich wie die COX-2 und die iNOS, bereits verstärkt strukturgebunden im Epithel vor. Eine Zunahme dieser drei Enzyme findet sich auch in Epithelzellen in direkter Nachbarschaft zu lymphatischem Gewebe.

In neoplastischem Dickdarmgewebe treten erhöhte *GI-GPx*-Spiegel auf (Florian et al., 2001). Mörk et al. (2000) beschrieben auch eine Verstärkung der *GI-GPx* mRNA in kolorektalen Adenomen.

Erhöhte *GI-GPx*-Spiegel finden sich in sporadischen kolorektalen Tumoren und auch bei FAP bereits in sehr frühen Entdifferenzierungsgraden. Die strukturgebundene Enzymfraktion tritt dann auch in den weiter basal gelegenen Kryptenkompartimenten auf; die kernständige Lokalisation ist nicht mehr nur auf die Zellen am Kryptengrund beschränkt. Im weiteren Verlauf der neoplastischen Transformation (ab G2/G3) verliert sich die strukturgebundene IR; gleichzeitig verteilt sich das Enzym verstärkt diffus im Zytoplasma und im Zellkern der

Tumorzellen. Eine Zunahme der kernständigen GI-GPx-Fraktion im Verlauf der Entdifferenzierung unterstützt die Hypothese, dass dem Enzym eine Bedeutung bei der Proliferation zukommt. Komatsu et al. (2001) beschrieben die GI-GPx im Zytoplasma und im Kern von Magenkarzinomzellen. Die Autoren vermuten ebenfalls, dass das Enzym nach der Translokation in den Nukleus eine Rolle bei der Redoxregulation von spezifischen Transkriptionsfaktoren spielt.

Von der cGPx und der PHGPx ist bekannt, dass sie die Hydroperoxid-vermittelte Apoptose hemmen, wenn sie durch Selen-Supplementation aufreguliert oder überexprimiert werden (Kayanoki et al., 1996; Packham et al., 1996; Nomura et al., 1999; Brigelius-Flohé et al., 2000), was den Prozess der neoplastischen Transformation begünstigen könnte. Andererseits kann die cGPx durch p53 induziert werden. Ein p53-Bindungsport wurde im cGPx Promoter beschrieben. Die cGPx könnte daher in initiierten Zellen auch einen antioxidativen Schutzeffekt gegen weitere DNA-Schäden durch Peroxide ausüben (Tan et al., 1999). Für die GI-GPx sind solche Daten jedoch nicht bekannt.

Auf Grund der apikal vom Zellkern gelegenen strukturgebundenen GI-GPx IR wurde eine mögliche Lokalisation des Enzyms im Golgi-Apparat vermutet. Doppelmarkierungsexperimente mit verschiedenen Golgi-Markern bestätigten dies nicht. Eigene Arbeiten ergaben jedoch, dass das Enzym, wenn es in dieser Lokalisation im Zytoplasma vorliegt, mit Calnexin, einem Markerprotein für das endoplasmatische Retikulum, co-lokalisiert. Von der COX-2 weiß man, dass sie an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Smith et al., 2000). Die übereinstimmende Lokalisation von COX-2 und GI-GPx an seriellen Schnitten unterstreichen die Aussage. Wie bereits beschrieben, sind auch die iNOS und Nitrotyrosin an diesen Strukturen lokalisiert. Das Vorkommen und die Verteilung dieser drei Enzyme stimmt in morphologisch intaktem Gewebe und im Verlauf des Entdifferenzierungsprozesses in hohem Maße überein. Eine anfängliche Hochregulation der GI-GPx in der Karzinogenese könnte somit als verstärkter Abwehrmechanismen gegen initiierte Entdifferenzierungsvorgänge interpretiert werden.

Da sowohl die COX-2 als auch die iNOS und die GI-GPx hochreguliert werden, noch bevor deutliche morphologische Veränderungen erkennbar sind, könnten sie sich auch als Marker für die Tumor-Diagnostik eignen. Darüber hinaus kann ein Monitoring dieser Enzymverteilungen zur Beurteilung präventiver bzw. therapeutischer medikamentöser oder diätetischer Strategien herangezogen werden.

5.1.1.4 15-LOX

Die verschiedenen Isoenzyme der Lipoxygenase und ihre Reaktionsprodukte wirken sowohl co-karzinogen, als auch antikarzinogen, wobei für die 15-LOX-1 und -2 eher antikarzinogene Effekte postuliert werden (Shureiqi und Lippman, 2001).

Besonderheiten in der Wirkung der 15-LOX-1 bestehen darin, dass sie nicht nur Arachidonsäure und Linolsäure dioxygeniert sondern auch ungesättigte Fettsäuren aus Phospholipiden, Cholesterolestern, Membranen und Lipoproteinen (Schewe, 2002). Diese bilden die Quelle für freie Radikale, die nichtenzymatische Peroxidationen und andere oxidative Prozesse initiieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 15-LOX-1 sowohl in nicht-neoplastischer als auch neoplastischer Mukosa ausschließlich in mobilen Stromazellen nachgewiesen. Das Enzym lag zytoplasmatisch diffus als auch membrangebunden vor. Die Translokation der 15-LOX vom Zytoplasma an intrazelluläre Membranen ist Ca^{2+} -abhängig und führt zur Aktivierung des Enzyms (Brinckmann et al., 1998). Bereits in frühen Entdifferenzierungsstadien ließen sich signifikant mehr 15-LOX-1 positive Zellen im Tumorstroma nachweisen als in gesundem Gewebe. Die Veränderungen der 15-LOX-1-Muster in Gewebeproben von Patienten mit sporadischen Tumoren und FAP waren ähnlich. Erste Ergebnisse von Doppelmarkierungen deuten darauf hin, dass es sich bei diesen 15-LOX-1 positiven Zellen ausschließlich um Eosinophile handelt (Dr. Gräbner, persönliche Mitteilung). Ikawa et al. (1999) fanden mittels Western Blot ebenfalls signifikant höhere 15-LOX-1-Spiegel in humanen Kolontumoren im Vergleich zu benachbarter unauffälliger Mukosa. Jedoch wiesen sie das Enzym sowohl in Tumoren als auch in normaler Mukosa im Epithel und in den Fibrozyten des Stromas nach. Shureiqi et al. (1999) dagegen detektierten immunhistochemisch signifikant verminderte 15-LOX-1-Spiegel im Tumorgewebe. Sie beschrieben auch eine zytoplasmatische 15-LOX-1 IR im Epithel. In Kontrollgeweben konnten sie sowohl mittels ELISA als auch mittels Immunhistochemie höhere 13-S-HODE-Spiegel als im Tumorgewebe nachweisen. In der Literatur finden sich keine weiteren Berichte zur 15-LOX-1-Verteilung im Dickdarm. Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse könnten Unterschiede im Untersuchungsgut, in der Spezifität der verwendeten Antikörper und im Einsatz sowohl von Paraffin- bzw. Kryoschnitten sein.

In Übereinstimmung mit Shureiqi et al. (1999), die in den drei transformierten kolorektalen Zelllinien HT-29, RKO und SW-620 keine 15-LOX-1 nachweisen konnten, wurde auch in dieser Arbeit im Immunblot von HT-29 Zellen keine 15-LOX-1 gefunden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis unterstützt die eigenen immunhistochemischen Befunde, die nur eine Expression in den mobilen Stromazellen belegen. Auch im Tumorstroma beschränkte sich die Expression der 15-LOX-1, wie Doppelmarkierungsexperimente mit Markern für

Makrophagen, Neutrophile und Eosinophile belegen, vorrangig auf Eosinophile (Dr. Gräbner, persönliche Mitteilung).

Biologische Funktionen der 15-LOX-1 sind nur teilweise bekannt. Am intensivsten untersucht ist ihre Funktion bei der Reifung der Retikulozyten, in Entzündungszellen bei der Modulation der Wirtsabwehrreaktionen und der Atherosklerose. Ob Gewebshormone, wie sie die 15-LOX-1 bildet, bei der kolorektalen Karzinogenese eine Rolle spielen, ist nicht geklärt.

Antikarzinogene Effekte sind für 13-S-HODE beschrieben. *In vitro* Daten an transformierten Kolonzelllinien unterstützen die Hypothese, dass 13-S-HODE die Zellproliferation inhibiert und die Apoptose induziert. Die Behandlung von transformierten RKO- und HT-29 Zellen mit 13-S-HODE unterdrückt die Proliferation, induziert den Zellzyklusarrest und die Apoptose (Shureiqi et al., 1999). Auch *in vivo* ist 13-S-HODE in der Lage, eine Hyperproliferation der Haut beim Meerschwein rückgängig zu machen (Miller und Ziboh, 1990). Solche Effekte wären auf Grund der Gewebshormonwirkung auch durch eine 15-LOX-1-Aktivität der Eosinophilen vermittelbar. Eine LOX-Reaktion mit NO könnte die katalytische Aktivität der 15-LOX-1 in Eosinophilen und die NO-abhängige Signaltransduktion hemmen (O'Donnell et al., 1999).

Ein weiterer Anhaltspunkt für eine antikarzinogene Wirkung ist die Beobachtung, dass die Inkubation von Caco-2 Zellen mit Butyrat, die zur Induktion von Differenzierung und Apoptose führt, mit einer Induktion der 15-LOX-1 assoziiert ist (Kamitani et al., 1998). Butyrat bewirkt außerdem eine Herunterregulation der COX-2 und eine Verschiebung der Arachidonsäuremetabolite von Prostaglandinen zu 15-LOX-Metaboliten (15-HETE). Auch NSAIDs sind in der Lage, die 15-LOX-1 in kolorektalen Tumorzellen zu induzieren. Dieser Effekt ist mit Wachstumshemmung und Apoptose assoziiert, woraus sich wiederum ein antikarzinogener Effekt ableiten lässt (Shureiqi et al., 2000, 2002). Es wird vermutet, dass die Balance des Fettsäuremetabolismus eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Differenzierung von kolorektalen Tumoren spielt.

Prokarzinogene Effekte von 13-S-HODE wurden ebenfalls publiziert. So verstärken die 15-LOX-1 Metabolite 13(S)-HODE/13(S)-HPODE die EGF-induzierte Mitogenese in syrischen Hamsterembryozellen. Der 15-LOX-2-Arachidonsäuremetabolit 15(S)-HETE war hingegen nicht aktiv (Glasgow et al., 1992, 1997). 13-(S)-HODE, 13-(R)-HODE und 13-(S)-HPODE verstärken in einer kolorektalen Zelllinie die Wachstumsfaktor-abhängige MAPK-Aktivität, die PPAR γ durch eine verstärkte Phosphorylierung herunterreguliert. Auf diese Weise könnte eine prokarzinogene Rolle von 15-LOX-1-Metaboliten in der kolorektalen Karzinogenese zustande kommen (Hsi et al., 2001).

Den Interpretationen von 15-LOX-1-Effekten auf die Karzinogenese steht jedoch z. T. entgegen, dass in dieser Arbeit *in vivo* keine Expression der 15-LOX-1 in normalen Epithelzellen des Dickdarms und während der Karzinogenese gefunden wurde. Die

Ergebnisse weisen darauf hin, dass, wenn die 15-LOX-1 eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielt, diese über die bindegewebigen Zellen vermittelt wird. Dies sollte bei zukünftigen Untersuchungen und der Interpretation von Daten berücksichtigt werden. Der Butyrateffekt sollte *in vivo* auf seine klinische Relevanz überprüft werden.

15-LOX-2 setzt Arachidonsäure bevorzugt zu 15-S-HETE um. Das Enzym wird im Gegensatz zur 15-LOX-1 durch Produkte der Fettsäureoxidation nicht suizidal inaktiviert. Die Aktivität wird aber ebenfalls durch eine Ca^{2+} -abhängige Assoziation des Enzyms mit Membranfraktionen der Zelle reguliert (Kilty et al., 1999).

Die 15-LOX-2 konnte in den Zellen der Lamina propria mucosae nachgewiesen werden. Zusätzlich tritt das Enzym im Epithel von Einzelkrypten, bevorzugt in der unteren Kryptenhälfte, unregelmäßig auf. In gut differenzierten Tumorstadien war der 15-LOX-2-Spiegel im Epithel am Kryptengrund leicht verstärkt; in schlecht differenzierten Arealen war das Enzym nicht mehr nachweisbar. In gut differenzierten Tumorearealen waren auch Stromazellen verstärkt 15-LOX-2 positiv. Die höchsten 15-LOX-2-Spiegel im Epithel wurden jedoch in frühen hyperplastischen Veränderungen und im Differenzierungsgrad G1 bei FAP-Proben detektiert. Hier lag das Enzym interessanterweise in der luminalen Kryptenhälfte vor. Auf subzellulärer Ebene war die Lokalisation sowohl in den mobilen Zellen als auch im Epithel strukturgebunden und diffus zytoplasmatisch verteilt. Die immunhistochemischen Daten zur 15-LOX-1- und -2-Expression werden durch eigene Immunblot-Befunde gestützt, in denen 15-LOX-2, nicht jedoch 15-LOX-1, in HT-29 Zellen nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Gegensätzliche Befunde publizierten Brash et al. (1997). Sie fanden mittels Northern Blot keine 15-LOX-2-Expression im humanen Kolon. Zur Expression der 15-LOX-2 im humanen Dickdarm liegen nur wenig Literaturangaben vor. Bekannt ist, dass das Enzym in humaner Lunge, Prostata und Cornea exprimiert wird (Brash et al., 1997). In benignem Prostataepithel ist 15-LOX-2 exprimiert, in Adenokarzinomen der Prostata liegt das Enzym jedoch vermindert vor. Keine IR gegen 15-LOX-2 wurde dagegen in Stromazellen, Zellen der Gefäße oder Entzündungszellen nachgewiesen (Shappell et al., 1999). Die 15-LOX-2 unterscheidet sich von der 15-LOX-1 nicht nur durch strukturelle Unterschiede sondern auch durch enzymatische Charakteristika. Die 15-LOX-2 wandelt Arachidonsäure ausschließlich zu 15S-HPETE um – dieses Hydroperoxid wird durch zelluläre Peroxidasen zu 15S-HETE umgesetzt. Im Gegensatz zur 15-LOX-1 wird Linolsäure nur schwach von der 15-LOX-2 metabolisiert (Brash et al., 1997). Die Daten über die Rolle von 15-S-HETE in der Karzinogenese sind widersprüchlich. Shappell et al. (2001) postulieren, dass eine verminderte 15-LOX-2-Expression in Prostatakarzinomen durch eine verringerte Transkription von PPAR γ -regulierten Genen zum malignen Phenotyp beiträgt. Tang et al. (2002) hingegen vermuten, dass die 15-LOX-2 ein Suppressor der Tumorentwicklung in der

Prostata ist, der die Proliferation hemmt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass das 15-LOX-2-Produkt 15(S)-HETE die Zellzyklus-Progression inhibiert. Kürzlich wurden drei Splicevarianten der 15-LOX-2 beschrieben: 15-LOX2sv-a/b/c (Kilty et al., 1999; Tang et al., 2002). Bhatia et al. (2003) postulieren, dass die 15-LOX-2 und die Splicevariante 15-LOX2sv-b die Entwicklung von Prostatatumoren unterdrücken.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl die 15-LOX-1 als auch die 15-LOX-2 in den Stromazellen exprimiert werden. Die 15-LOX-2 wird zusätzlich auch im Epithel und Gefäßen synthetisiert. Beide Enzyme werden im Verlauf der Entdifferenzierung in den Stromazellen hochreguliert, die 15-LOX-2 im Gegensatz zur 15-LOX-1 auch in den Epithelzellen.

Beide Enzyme können sowohl diffus als auch membrangebunden im Zytoplasma vorliegen, wobei die 15-LOX-1 eher unregelmäßig strukturgebunden im Zytoplasma der mobilen Zellen auftritt, die 15-LOX-2 dagegen an distinkte zytoplasmatische Membranen, die wiederum zusammengelagert erscheinen, gebunden ist.

Unterschiedliche Gewebsverteilung und Substratspezifität sowie verschiedene lokal wirksame primäre Metabolite lassen auf unterschiedliche Funktionen beider Isoenzyme schließen, auch bei pathologischen Prozessen wie der kolorektalen Karzinogenese.

Im Gegensatz zur COX-2 pc, iNOS und GI-GPx ließ sich für die 15-LOX-2 keine verstärkte Expression in morphologisch intaktem Gewebe bei FAP nachweisen.

5.1.2 Vergleichende Untersuchungen am DMH-Tumormodell der Ratte

Präventive Maßnahmen zur Unterdrückung der kolorektalen Karzinogenese sind am Menschen schwer zu überprüfen. Ergebnisse an Zellkulturen spiegeln die komplexe Situation *in vivo* immer nur ungenügend wider. Deshalb ist es erforderlich, experimentelle Studien in Tiermodellen vorzunehmen. Im Vorfeld sollte aber feststehen, ob prinzipielle pathologische Veränderungen in der Karzinogenese von Mensch und Ratte vergleichbar sind, so dass die gewonnenen tierexperimentellen Erkenntnisse auch auf den Menschen übertragbar sind. Diese Fragestellung lag den Arbeiten am chemisch induzierten kolorektalen 1,2-DMH-Tumormodell der Ratte zugrunde.

1,2-Dimethylhydrazin ist ein organotropes Kolonkarzinogen, das durch metabolische Aktivierung DNA-reaktive Metabolite erzeugt. Das DMH-Modell ist durch Mutationen u. a. im β -Catenin- und K-ras-Gen sowie die Bildung von ACFs im distalen Dickdarm und Tumoren charakterisiert (Llor et al., 1991; Blum et al., 2001; Tucker et al., 2003). Es wird vermutet, dass die Karzinogenese im proximalen Kolon einer *de novo* Sequenz folgt ohne das Stadium von ACFs zu passieren, was zur Entwicklung schlecht differenzierter muzinöser Karzinome führt. Im mittleren und distalen Dickdarm dagegen entspricht die Tumorentstehung einer ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz aus der besser differenzierte Tumore resultieren (Sunter

et al., 1978; Sunter, 1980; Cameron et al., 1996; Park et al., 1997). ACFs sind fokale Läsionen mit erhöhter proliferativer Aktivität und Zellzahl (McLellan et al., 1991). Sie haben eine hohe Inzidenz von K-ras-Mutationen (Stopera et al., 1992; Vivona et al., 1993) und sind pathologisch und genetisch heterogen (Bird, 1995). Man vermutet, dass Sialomuzin-produzierende ACFs mehr Veränderungen aufweisen, fortgeschrittener sind und damit bessere Marker für ein Krebsrisiko darstellen, als solche, die Sulphomuzin produzieren (Jenab et al., 2001). Es wird postuliert, dass ein Teil der ACFs präneoplastische Läsionen darstellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten 6 von 12 Tieren der Kontrollgruppe nach DMH-Behandlung ein bis zwei Tumore. ACFs traten bei allen Tieren distal der proximalen Faltung des Dickdarms auf. Die Befunde der immunhistochemisch untersuchten ACFs wurden mit denen aus direkt benachbartem Epithel verglichen. Da ACFs morphologisch sehr inhomogen sind und nur eine geringe Anzahl untersucht wurde, lassen sich Signifikanzberechnungen nur bei einer großen Anzahl von ACF-Untersuchungen rechtfertigen. Es konnte festgestellt werden, dass in den Rattentumoren prinzipiell die gleichen Entdifferenzierungsgrade wie in humanen Tumorproben auftreten.

Unterschiede in der IR der vergleichend untersuchten Proteine waren oftmals zwischen proximalem und distalem Kolon stärker ausgeprägt, als zwischen distalem Kolon, den ACFs und den Tumoren. Morphologische und funktionelle Unterschiede zwischen proximalem und distalem Kolon der Ratte sind in der Literatur gut belegt (Ma et al., 2002). So befindet sich die Proliferationszone im proximalen Kolon in der mittleren Krypte; im distalen Kolon ist sie am Kryptengrund lokalisiert. Die Proliferationszone im distalen Kolon ist größer. Es wird postuliert, dass die Zellen im proximalen Kolon in Richtung Lumen und Kryptengrund migrieren, während sie im distalen Kolon nur in Richtung lumenale Oberfläche wandern (Sato und Ahnen, 1992). Des Weiteren sind im proximalen Kolon die Becherzellen am Kryptengrund und die Saumzellen am luminalen Saum lokalisiert. Distal gibt es in der basalen Krypte weniger Becherzellen (Shamsuddin und Trump, 1981). Es wird vermutet, dass die histochemischen Ähnlichkeiten zwischen dem distalen Rattenkolon und dem humanen Kolon es erlauben, das distale Kolon der Ratte als Modell für die kolorektale Tumorentwicklung beim Menschen zu verwenden (Ma et al., 2002)

5.1.2.1 COX

Vergleicht man die Verteilung der untersuchten Proteine im Dickdarm des Menschen und der Ratte, so ist festzustellen, dass die Muster von COX-1 und COX-2 im distalen und im Wesentlichen auch im proximalen Kolon der Ratte sehr gut mit den humanen Befunden übereinstimmen. Dies trifft sowohl für nicht-neoplastisches als auch für entdifferenziertes

Gewebe zu. Die COX-2 mc IR war insgesamt stärker als die der COX-1 ausgeprägt. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde korrelieren bezüglich der zellulären und subzellulären Lokalisation beider Isoenzyme im normalen Gewebe der Ratte und teilweise im Tumor mit den Arbeiten von Vogliagis et al. (2001). Nicht auszuschließen ist, dass auch das COX-1-Gen der DMH-Ratte eine COX-1-Splicevariante exprimiert. Mittels semiquantitativer RT-PCR konnten Gustafson-Svard et al. (1996) ebenfalls erhöhte COX-1- und COX-2-Spiegel in Kolontumoren der Ratte nachweisen. Sie nahmen jedoch keine Analyse der zellulären Verteilung vor. Bissonnette et al. (2000) fanden eine verstärkte COX-2-Expression in AOM-induzierten Tumoren und stellten heraus, dass sich die Expression und Lokalisation des Enzyms in Abhängigkeit von ras- oder β -Catenin-Mutationen bzw. nicht-mutagen erfolgter Aktivierung des p21^{ras}-Gens unterscheiden.

Unsere Befunde, die mit dem polyclonalen COX-2-Antikörper erhoben wurden, stimmen insoweit mit den Ergebnissen der Humanstudie überein, als auch eine COX-2 pc-Lokalisation bei der Ratte bevorzugt im Epithel, weniger in den Stromazellen, nachgewiesen werden konnte. Sie trat im distalen Kolon, ähnlich wie in den Humanproben, im Saume epithel in feinsten Strukturen apikal vom Zellkern auf. Im Verlauf der Entdifferenzierung wurde bei der Ratte, im Gegensatz zum Menschen, mit diesem Antikörper keine Hochregulation der COX-2 nachgewiesen.

5.1.2.2 NOS

Die iNOS ist auf subzellulärer Ebene in morphologisch intaktem Gewebe der Ratte, ähnlich wie beim Menschen, fast deckungsgleich mit der COX-2 pc lokalisiert. Analog zum Menschen wurde im Tumorstroma ebenfalls eine Erhöhung der iNOS-Spiegel in mobilen Zellen nachgewiesen. Im Epithel waren dagegen bei der Ratte die iNOS-Spiegel weder im Tumor noch in den ACFs signifikant erhöht. Femia et al. (2002) berichten über erhöhte iNOS mRNA-Spiegel in AOM-induzierten Tumoren im Vergleich zur Normalmukosa. Takahashi et al. (2000) fanden im AOM-induzierten Modell sowohl in Makrophagen als auch im Tumorepithel verstärkte iNOS-Spiegel. Sie konnten nur in dysplastischen ACFs, nicht aber in hyperplastischen ACFs, eine schwache iNOS IR detektieren. Daraus schlussfolgerten sie, dass Veränderungen im β -Catenin-Muster in die Induktion der iNOS involviert sein könnten, da sie auch β -Catenin nur in dysplastischen ACFs nachweisen konnten. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass die Hochregulation der iNOS beim Menschen wesentlich früher erfolgt als die Translokation von β -Catenin in den Zellkern (Marinović, 2003).

Auf Grund der geringen Anzahl von Saumzellen, in denen COX-2 pc und iNOS vorhanden waren, kommen Unterschiede in der Verteilung bei Verwendung des erarbeiteten Scores nicht genügend zum Ausdruck. In weiterführenden Untersuchungen sollte die IR durch Auszählen der positiven Epithelzellen quantifiziert werden.

Zusätzlich wurde bei der Ratte auch die nNOS untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym konstitutiv in den Epithelzellen des Rattendarmes exprimiert wird. Die höchsten nNOS-Spiegel wurden im Saumepithel nachgewiesen, wobei die Spiegel im distalen Kolon höher waren als im proximalen. Die nNOS-Muster in den Epithelzellen bei DMH-Ratten ähneln in Bezug auf die subzelluläre Verteilung und z. T. auch auf die zelluläre Verteilung sehr stark der iNOS beim Menschen. Das Enzym liegt zwar beim Menschen in morphologisch intaktem Gewebe fast ausschließlich im Saumepithel vor, tritt aber, ebenso wie die nNOS bei der Ratte, in frühen dysplastischen und hyperplastischen Veränderungen der Schleimhaut und in Tumoren verstärkt auf. Kürzlich wurde berichtet, dass sich im Kolon und Rektum der Ratte vier 5'nNOS-Varianten unterscheiden lassen (Saur et al., 2002), beim Menschen sogar 9. Die Vielzahl dieser Varianten soll aus Unterschieden in der Basenfolge in Exon 1 resultieren. Der Frage der funktionellen Bedeutung der nNOS-Varianten wurde in dieser Arbeit nicht nachgegangen.

5.1.2.3 GI-GPx

Ähnlich wie für die zuvor diskutierten Enzyme weist auch die GI-GPx in ihrer zellulären Lokalisation im distalen Kolon bei Mensch und Ratte Gemeinsamkeiten auf. Die subzelluläre Enzymlokalisierung unterscheidet sich jedoch. Am Kryptengrund gleicht sie der im humanen Dickdarm. Im luminalen Saumepithel der Ratte findet sich dagegen eine diffuse Verteilung im Zytoplasma. Eine GI-GPx-Fraktion an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums konnte im distalen Kolon der Ratte weder in intaktem, noch in neoplastischem Gewebe nachgewiesen werden. Im distalen Kolon wird die GI-GPx viel stärker als im proximalen Kolon exprimiert. Die Unterschiede in der subzellulären Verteilung sind Spezies- und nicht DMH-bedingt, denn das Enzym zeigt im TNBS-Modell unter physiologischen Bedingungen ein gleiches Expressionsmuster. Die Befunde lassen darauf schließen, dass auch funktionelle Unterschiede in der GI-GPx-Wirkung bei Mensch und Ratte existieren. Möglicherweise gilt für die Ratte eher die Hypothese der Barrierfunktion (Chu et al., 1993; Wingler et al., 2000), zumal die Enzymexpression im Saumepithel sehr konstant ist. Diese Deutung erklärt jedoch nicht die Unterschiede in der GI-GPx-Expression im proximalen und distalen Kolon. Die Erklärung dafür könnte im unterschiedlichen Differenzierungsablauf in den beiden Darmabschnitten liegen.

Ähnlich wie in humanen Tumorproben ist auch in DMH-Tumoren die GI-GPx verstärkt diffus zytoplasmatisch und kernständig im Epithel nachweisbar. In ACFs lassen sich diese Veränderungen auch beobachten, sie sind jedoch nur schwach ausgeprägt. Esworthy et al. (1998) beschrieben, dass die GI-GPx im Epithel des Gastrointestinaltraktes von erwachsenen Ratten exprimiert wird. Chu et al. (1997) vermuten eine Korrelation zwischen der GI-GPx-Expression und der Resistenz gegenüber DMH-induzierten kolorektalen

Tumoren. Das leiteten sie aus höheren GI-GPx-Spiegeln bei einem DMH-resistenten Mausstamm im Vergleich zu einem DMH-sensitiven Mausstamm ab.

Diese Befunde, in Verbindung mit den bereits unter 5.1.1.3 diskutierten Daten, unterstützen die Auffassung, dass die GI-GPx eine protektive Rolle gegenüber der kolorektalen Karzinogenese spielt.

5.1.2.4 15-LOX

Eine 15-LOX-1 IR in der Ratte war mit dem verwendeten Antikörper nicht detektierbar. Das der 15-LOX-1 entsprechende Enzym der Ratte ist die Leukozytentyp 12-LOX. Beide Enzyme unterscheiden sich nur in einer Aminosäure. Aus diesem Grunde erwarteten wir auch für den Antikörper, der gegen 15-LOX-1 generiert wurde, eine Immunreaktivität. Diese war jedoch nicht nachweisbar.

Die 15-LOX-2 des Menschen entspricht der 8-LOX der Ratte. Das Enzym ließ sich mit dem Antikörper, der die 15-LOX-2 nachweist, gut detektieren. Bei der DMH-behandelten Ratte, ähnlich wie beim Menschen, tritt das Enzym sowohl in den Stromazellen als auch im Epithel auf. Die IR war insgesamt sehr schwach ausgeprägt, im distalen jedoch stärker als im proximalen Kolon. Im Saumepithel des intakten distalen Kolons war eine schwache IR zu beobachten, die der in frühen Entdifferenzierungsstadien bei FAP ähnelte, nicht jedoch dem Normalbefund. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass das Enzym in der Epidermis der Maus durch Phorbolester, bekannte Tumorpromotoren, induzierbar ist (Fürstenberger et al., 1991; Krieg et al., 1998). Möglicherweise ist die Expression der 8-LOX auch DMH-vermittelt, da das Enzym im TNBS-Modell nicht nachgewiesen werden konnte. In den ACFs und im Tumor waren die 8-LOX-Spiegel nicht wesentlich verändert. Dieser Befund unterscheidet sich von den humanen Befunden, denn bei der FAP wurden erhöhte 15-LOX-2-Spiegel im Epithel gut differenzierter Tumoreareale nachgewiesen und bei beiden, FAP- und sporadischen Tumoren, eine Hochregulation der 15-LOX-2 in den Stromazellen.

5.1.2.5 HSP25

HSPs werden in Zellen als Reaktion auf verschiedene Stress-Faktoren induziert (Hightower, 1991). Sie verbessern das Überleben von Zellen in einer Vielzahl von Stresssituationen. HSP25 ist ein Mitglied dieser Proteinfamilie und das murine Homolog zum humanen HSP27. Das Protein wurde sowohl im distalen als auch im proximalen Kolon hauptsächlich in Muskelzellen, fixen und mobilen Stromazellen sowie in Gefäßwänden nachgewiesen. Im distalen, aber nicht im proximalen Kolon, treten zusätzlich vereinzelt positive Epithelzellen am luminalen Saum auf. Die eigenen Ergebnisse stimmen sehr gut mit Literaturangaben zur physiologischen Expression von HSP25 in Ratte und Maus überein (Wilkinson und Pollard, 1993; Wakayama und Iseki, 1998). Im Tumorepithel und -stroma waren die HSP25-Spiegel

leicht erhöht. Angaben zum Verhalten des HSP25 in Tumoren liegen bisher in der Literatur nicht vor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die COX-1, COX-2 (mc, pc), die iNOS, die GI-GPx und in geringerem Maße die 8-LOX in morphologisch intaktem distalen Kolon von DMH-Ratten ein ähnliches Enzym-Verteilungsmuster zeigen wie in intakten kolorektalen Gewebeproben des Menschen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen tumortragenden Tieren und Tieren ohne Tumorentwicklung festgestellt werden.

Im neoplastischen Epithel nehmen die GI-GPx-Spiegel bei beiden Spezies zu. Die nNOS war im Verlauf der Entdifferenzierung leicht verstärkt, wobei die zelluläre und subzelluläre Verteilung der iNOS beim Menschen gleich. Abweichend von den Befunden beim Menschen war dagegen keine Hochregulation von COX-2 pc und iNOS im Tumorepithel der Ratte festzustellen. Das Hitzeschockprotein HSP25 war im Epithel von DMH-Tumoren leicht erhöht.

Im Tumorstroma wurden im DMH-Modell, analog wie beim Menschen, verstärkte COX-1-, COX-2- und iNOS- und zusätzlich auch erhöhte HSP25-Spiegel nachgewiesen. Im Gegensatz zum Menschen trat in den Zellen des Tumorstromas keine Erhöhung der 8-LOX-Spiegel auf.

Eine weitere Übereinstimmung besteht im Dickdarm von Mensch und Ratte hinsichtlich des gehäuftten Auftretens von COX-1, COX-2, iNOS, GI-GPx sowie auch von nNOS und HSP25 positiven Zellen in der Mukosa in direkter Nachbarschaft zu lymphatischem Gewebe.

In intaktem proximalem Dickdarmgewebe der Ratte besteht Übereinstimmung in der strukturgebundenen Lokalisation von COX-2 pc, iNOS und GI-GPx, allerdings am Kryptengrund und nicht wie beim Menschen im Saumeepithel. Diese Befunde unterstützen die Aussage, dass die Zellen im proximalen Kolon auch in Richtung Kryptengrund differenzieren (Sato und Ahnen, 1992).

Als Marker für ACFs und damit für frühe Entdifferenzierungsprozesse eignen sich bei der Ratte auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit, die nNOS und, in geringerem Maße, die GI-GPx.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass, im Hinblick auf die Situation im humanen Kolon, besonders das distale Kolon der Ratte vergleichbare morphologische und immunhistochemische Charakteristika zeigt. Auch pathophysiologisch wichtige Veränderungen in der Enzymexpression während der Entdifferenzierung ließen sich im Modell wiederfinden. Die umfassende Charakterisierung des DMH-Modells war Grundlage, um die Frage zu klären, ob die orale Aufnahme einer butyrogenen RS III die Tumorentwicklung unterdrücken kann.

5.1.3 Einfluss von RS III auf die kolorektale Karzinogenese im DMH-Modell der Ratte

In dieser Arbeit konnte experimentell belegt werden, dass die Tumorstehung im 1,2-DMH-induzierten kolorektalen Tumormodell bei Sprague-Dawley-Ratten durch RS Typ III vollständig hemmbar ist. Unter der RS-Diät war eine verminderte Anzahl und Größe der ACFs festzustellen. Unterstützt werden diese Befunde durch parallele Untersuchungen, in denen nach Gabe einer mit RS III/Rutin angereicherten Diät ebenfalls keine Tumorentwicklung auftrat (Daten nicht gezeigt).

Das verwendete RS-Präparat wurde sehr gut durch die intestinale Mikroflora fermentiert und lieferte signifikant höhere SCFA- und Butyrat-Konzentrationen in Zökum und Dickdarm als unter Standarddiät (Prof. Jacobasch, persönliche Mitteilung). In der Kontrollgruppe lagen die Butyrat-Konzentration im Zökum bei 35-40 $\mu\text{mol/g}$ TM und im distalen Kolon bei 15 $\mu\text{mol/g}$ TM. Unter RS-Zusatz wurden im Zökum 48 $\mu\text{mol/g}$ TM und im distalen Kolon 30 $\mu\text{mol/g}$ TM Butyrat erreicht. Ballaststoffe, einschließlich RS-Präparate, sind in der Lage, Gallensäuren zu binden und diese in den Dickdarm zu transportieren, wo sie erst durch den Kohlenhydratabbau freigesetzt werden. Die Menge an Gallensäuren, die dadurch in den Dickdarm gelangt, hängt somit auch von der mit der Nahrung zugeführten RS III-Menge ab. Unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen wurden in der RS-Gruppe 20 % mehr Gallensäuren im Zökum und 5 % mehr im Kolon als in der entsprechenden Kontrollgruppe nachgewiesen. Trotzdem war der Anteil an zytotoxischen sekundären Gallensäuren in beiden Dickdarmabschnitten in der RS-Gruppe geringer (Prof. Jacobasch, Dr. Dongowski; persönliche Mitteilung). Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass der pH-Wert durch die Fermentation von RS III stark abfällt und die mikrobielle 7α -Dehydroxylase hemmt, die an der Bildung potentieller Tumorpromotoren, wie die der Desoxycholsäure beteiligt ist (Jacobasch und Dongowski, 2000). Zusätzlich wird der onkogene Effekt der sekundären Gallensäuren direkt durch Butyrat weitgehend unterdrückt (Velazquez et al., 1997).

Einen protektiven Effekt wiesen auch Perrin et al. (2001) im AOM-induzierten Tumormodell bei BDIX-Ratten nach Gabe von RS Typ III (retrogradierte amylosereiche Maisstärke, Cerestar) anhand einer verminderten ACF-Bildung bei gleichzeitig erhöhter Butyrat-Konzentration nach. Über eine verringerte Bildung von ACFs am DMH-Modell nach Gabe von RS berichteten auch Cassand et al. (1997). Maziere et al. (1998) fanden demgegenüber mit einer RS III (retrogradierte amylosereiche Maisstärke) keine signifikante Verminderung der ACFs im DMH-Modell bei Sprague-Dawley-Ratten nach vierwöchiger Versuchsdauer. Eigene Befunde belegen, dass offensichtlich die Rattenspezies und das Alter der Tiere einen Effekt auf die Tumorbildung und die Prävention mit RS III haben. So war es nicht möglich bei adulten Wistar-Ratten, auch nach 52 Wochen Versuchsdauer, eine Tumorbildung in der Kontrollgruppe oder der RS-Gruppe zu erreichen. Die pathologischen Veränderungen im

Dickdarm beschränkten sich auf ACFs und Hyperplasien. Unter der RS-Diät traten bei diesem Modell verstärkt ACFs mit einer größeren Anzahl Krypten pro Focus, großflächige Hyperplasien und zystische Veränderungen der Schleimhaut auf (Anhang A2-A5).

Eigene Beobachtungen und die zum Teil widersprüchlichen Literaturdaten lassen darauf schließen, dass sowohl die genetische Ausstattung und das Alter der Tiere, die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora, die Applikationsart der Noxe, das Versuchsdesign, die Quelle sowie die Eigenschaften der RS und die Zusammensetzung der Diät für die therapeutische Beeinflussung der Tumorenstehung im Tiermodell von Bedeutung sind.

Im histologischen Bild konnte unter RS im DMH-Modell bei Sprague-Dawley-Ratten ein regelmäßigerer Schleimhautaufbau beobachtet werden, was die geringere Inzidenz von ACFs widerspiegelt.

Auf Tumorzellen übt Butyrat einen anderen Effekt aus, als auf gesundes Gewebe. In malignen Zellen hemmt Butyrat dosis-abhängig die Zellproliferation, induziert verschiedene Differenzierungs- und revertante Phänotypen und aktiviert die Apoptose, wodurch die Tumorprogression gehemmt wird. Außerdem hemmt Butyrat sowohl die Angiogenese als auch die Entzündung und steigert die Immunosurveillance. In der Zellzykluskontrolle kommt der Erhaltung des G1-Arrestes eine besondere Bedeutung zu, da nur dadurch eine Reparatur von DNA-Schäden vor der Replikation ermöglicht wird. Der Tumorsuppressor p53 induziert verschiedene Proteine, die den Zellzyklus regulieren, darunter auch p21, das den G1-Arrest kontrolliert, da es die Aktivität der zyklinabhängigen Kinasekomplexe von Cyclin-D1, -D2 und -E blockieren kann. Mutationen in p53, wie sie bei ca. der Hälfte aller kolorektalen Tumore auftreten, zerstören diesen Kontrollmechanismus. p21 zählt aber zugleich zu den Proteinen, die durch Butyrat hochreguliert werden, was wahrscheinlich die antikarzinogene Wirkung dieses Metaboliten erklärt. Butyrat erhöht in HT-29 Zellen auch die Glutathionsulfotransferasen GSTT1, GST-pi-1, GSTA-1, sowie HSP20, 40 und 70, woraus eine verbesserte Barrierfunktion resultiert. Acetylierung und Deacetylierung von Corehistonen durch Histonacetyltransferasen sind dabei Schlüsselprozesse der Transkriptionskontrolle. In sie greift Butyrat als Deacetylaseinhibitor ein (Williams et al., 2003; Blottiere et al., 2003; Sowa und Sakai, 2003; Csordas, 1996).

Ergebnisse von cDNA-Mikroarray-Studien an Kolonepithelzellen zeigen, dass Butyrat eine Vielzahl von Genen hoch- und herunterregulieren kann (Tabuchi et al., 2002; Williams et al., 2003).

Durch die immunhistochemische Analyse waren im DMH-Modell nach RS-Gabe Veränderungen im Expressionsmuster von tumorassoziierten Enzymen in der morphologisch intakten Schleimhaut nachweisbar.

Der COX-1-Spiegel war in den Krypten und den Stromazellen signifikant erhöht, auch die Zellen der Lamina muscularis mucosae, der Tunica muscularis und Endothelzellen reagierten vergleichsweise intensiver. Es ist bekannt, dass die von der COX-1 gebildeten Prostaglandine Gewebshormonfunktionen haben. Für die COX-2 mc, die ähnlich wie die COX-1 lokalisiert ist, war proximal in den Stromazellen eine signifikante Abnahme und distal eine tendenzielle Erhöhung feststellbar.

Der Spiegel der COX-2 pc war im Epithel des proximalen und distalen Kolons tendenziell erhöht. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass sowohl in prämaligen Adenomzellen als auch in HT-29 Zellen die COX-2-Expression durch Butyrat hochreguliert wird. Im Ergebnis wird die Apoptose aktiviert; ein Wachstumsarrest tritt ein (Crew et al., 2000). Der beobachtete leichte Anstieg der COX-2 im Saumepithel unter RS könnte somit in Verbindung mit einer gesteigerten Apoptoserate stehen, die dazu beiträgt, das Fließgleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose innerhalb der Epithelzellen einer normalen Krypte aufrecht zu erhalten und somit einem Entdifferenzierungsprozess entgegen zu steuern. Da die Signalübertragung für diesen Effekt auch über die PKC erfolgt, würde zugleich verständlich, warum die PKC- δ unter RS in den luminalen Epithelzellen signifikant erhöht wird (Marinović, 2003).

Die kernständige und die diffus-zytoplasmatische Fraktion der GI-GPx war nach RS-Gabe im distalen Kolon am Kryptengrund signifikant vermindert. Dies könnte ein Anhaltspunkt für einen verminderten mitotischen Index und eine geringere Entartungswahrscheinlichkeit unter RS sein, da, wie in dieser Arbeit gezeigt, der Prozess der Entdifferenzierung bereits in frühen Stadien sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte mit einer Erhöhung der GI-GPx-Spiegel und einer Ausdehnung der GI-GPx positiven Zellen in Richtung Lumen einhergeht.

Unter der RS-Diät wurde HSP25 im distalen Kolon signifikant häufiger und verstärkt in einzelnen Saumzellen nachgewiesen. Im proximalen und distalen Kolon war HSP25 auch in den Zellen der Lamina propria tendenziell verstärkt. HSPs zählen zu den zahlreichen Proteinen, die durch Butyrat induziert werden (Williams et al., 2003). Ren et al. (2001) berichteten über eine starke Induktion von HSP25 in Dünndarmepithelzellen der Ratte (IEC-18) und auch in einer humanen Kolonkarzinomzelllinie (Caco2-bbe) nach Behandlung mit 5 mmol/L Butyrat. Die Autoren konnten zeigen, dass die SCFA-induzierte Expression von HSP25 eine verstärkte zelluläre Resistenz gegenüber oxidativem Stress bewirkte. Die Antwort auf Butyrat war hochselektiv für HSP25, im Gegensatz zu der Antwort auf Hitzeschock. Die hier beobachtete Lokalisation und Morphologie der HSP25 positiven Zellen im Saumepithel der Mukosa könnten darauf hinweisen, dass die verstärkte Expression des Proteins unter RS ebenfalls mit Prozessen der Apoptose assoziiert ist.

Veränderungen zeigten sich unter der RS-Diät auch im β -Catenin-Muster. Die membranständige Fraktion von β -Catenin nahm im distalen Kolon zu (Marinović, 2003).

Möglicherweise werden über eine Verstärkung des membranständigen β -Catenins Zelladhäsionseffekte der Krypte verändert (Barshishat et al., 2000).

Die Enzymmuster der iNOS, nNOS und 8-LOX veränderten sich unter RS III-Gabe nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter den in dieser Arbeit ausgewiesenen Versuchsbedingungen das eingesetzte RS III-Präparat die Tumorbildung bei der DMH-Ratte vollständig unterdrückt und die Butyrat-Konzentration im Dickdarmlumen erhöht. Aus der erhöhten Butyrat-Konzentration resultiert eine Erhöhung des Substratangebots für die aerobe Energiegewinnung und ATP-abhängige Reaktionen, die zum Erhalt der Mukosa-Homöostase beitragen. Außerdem beeinflusst Butyrat als Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Proteine, die zur Unterdrückung der Tumorbildung beitragen können.

5.2 CED

5.2.1 CED – Graduierung und immunhistochemische Untersuchungen

Der entwickelte histologische Score bildete die Grundlage zur Beurteilung des Verhaltens der analysierten Enzyme in Abhängigkeit vom Grad der Entzündung in den einzelnen Schichten der Darmwand.

Bei der CU korrelierten die COX-2- pc, iNOS- und GI-GPx-Spiegel im Epithel positiv mit dem Grad der Entzündung. Dabei stimmte die zelluläre und subzelluläre Verteilung dieser drei Enzyme in hohem Maße überein. Auch der 15-LOX-2-Spiegel stieg mit zunehmender Entzündung im Epithel leicht an. Die perinukleäre COX-2 mc und z. T. auch die COX-1 nahmen dagegen mit zunehmendem Entzündungsgrad ab (Abb. 5-5). In den Zellen der Lamina propria, und bei starker Entzündung auch in der Tela submucosa, waren mit zunehmendem Grad der Entzündung alle untersuchten Enzyme erhöht (Abb. 5-6).

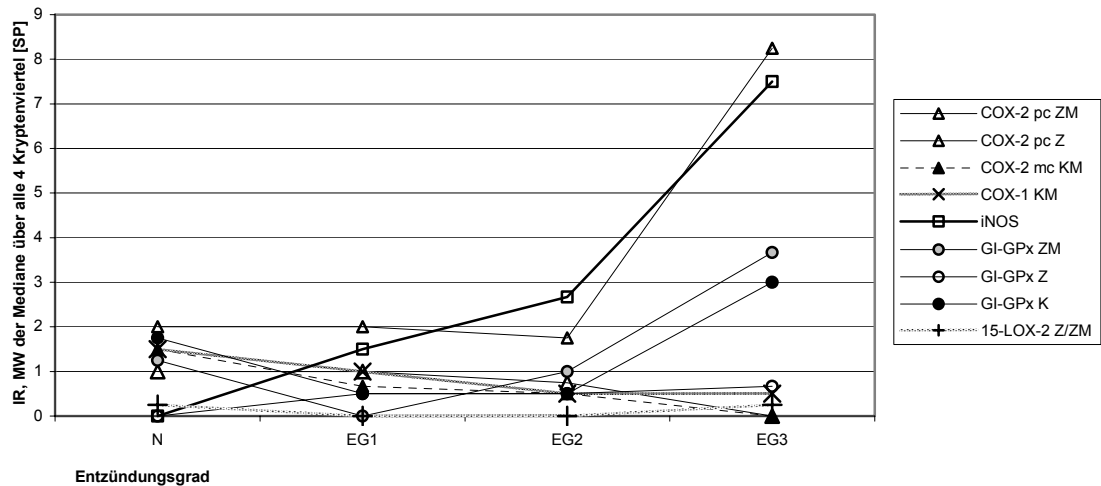


Abb. 5-5: Schematische Darstellung des Verhaltens der COX-1, COX-2 (pc, mc), iNOS, GI-GPx und 15-LOX-2 in der Lamina epithelialis in morphologisch intaktem kolorektalen Gewebe von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren und in Abhängigkeit vom Grad der Entzündung bei Patienten mit CU

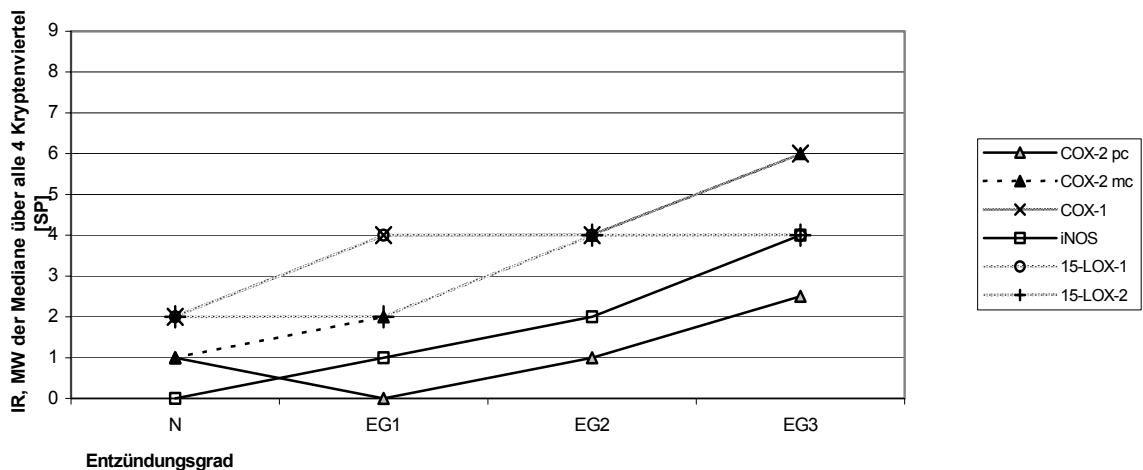


Abb. 5-6: Schematische Darstellung des Verhaltens der COX-1, COX-2 (pc, mc), iNOS, 15-LOX-1 und 15-LOX-2 in der Lamina propria in morphologisch intaktem kolorektalen Gewebe von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren und in Abhängigkeit vom Grad der Entzündung bei Patienten mit CU

Im Entzündungsgrad 3 zeigten sich im Epithel ähnliche Veränderungen in den Proteinmustern wie in Tumoren des Differenzierungsgrads G1 und in frühen hyperplastischen Läsionen. In den Stromazellen entsprachen die Enzymmuster bei diesem Entzündungsgrad dagegen eher den Entdifferenzierungsstadien G1-G3 sporadischer kolorektaler Tumore.

Auffällig war, dass im Epithel beim Entzündungsgrad 1 für fast alle Enzyme (außer iNOS) tendenziell geringere Spiegel als in morphologisch intakten Proben von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren festgestellt wurden (Abb. 5-5). Im Stroma waren die Spiegel der meisten Enzyme zu diesem Zeitpunkt dagegen bereits erhöht (Abb. 5-6). Dieser

Befund könnte dahingehend gewertet werden, dass auch bei Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren bereits in morphologisch intakter Mukosa eine Änderung im Expressionmuster dieser Enzyme im Epithel einsetzt. Gleichzeitig weisen die erhöhten Enzymspiegel in den Stromazellen im Entzündungsgrad 1 auf eine wichtige Rolle der bindegewebigen Zellen bei der Entstehung der CU hin.

5.2.1.1 COX

Aus Arachidonsäure werden nicht nur eine Vielzahl von bedeutenden Signalmetaboliten gebildet sondern auch ROS. In diesem Zusammenhang werden den COX-Isoenzymen in der Entzündung unterschiedliche Funktionen beigemessen. Z. B. vermittelt die COX-2 proinflammatorische Effekte. Prostaglandine der COX-1 wirken zytoprotektiv und regulieren dadurch die gastrointestinale Homöostase (Appleton et al., 1996; Masferrer et al., 1996). Die COX-2-Funktion scheint jedoch auch günstig für den Remissionserhalt bei Kolitis, da eine selektive Hemmung des Enzyms die Erkrankung verstärken kann (Sakamoto, 1998).

Sowohl mit dem polyclonalen als auch mit dem monoclonalen COX-2-Antikörper konnten mit zunehmendem Entzündungsgrad signifikant höhere COX-2-Spiegel nachgewiesen werden. Ebenso wie bei den humanen Tumorproben zeigten beide Antikörper eine verstärkte COX-2 IR in ähnlicher Lokalisation in den Zellen der Lamina propria - besonders in der Nähe von Ulzerationen - und der Tela submucosa. Im Epithel wurde dagegen nur mit dem polyclonalen Antikörper mit steigendem Entzündungs- und Dysplasiegrad der Krypten eine signifikant stärkere, strukturegebundene IR apikal vom Zellkern festgestellt. Dieser Befund war, ebenso wie bei den Tumorproben, im Kolon tendenziell stärker als im Rektosigmoid ausgeprägt.

Die COX-2 war bei allen Entzündungsgraden, mit einem sprunghaften Anstieg der Konzentration von Grad 2 nach 3, nachweisbar. Das bedeutet, dass der COX-2-Spiegel im akuten Schub sein Maximum erreicht. In diesem Stadium ist auch der Dysplasiegrad am stärksten ausgeprägt. In der Literatur wird die Auffassung vertreten, dass die COX-2-Überexpression auch ein frühes Ereignis bei der CU ist, beginnend in der Mukosa, die diploid, nicht dysplastisch und nicht entzündet ist. Nur ein Teil der COX-2-Überexpression spiegelt Entzündungsvorgänge wider. Vorrangig ist die COX-2-Expression mit der neoplastischen Progression assoziiert. Die COX-2 ist in allen aneuploiden Proben und in einem Drittel der diploiden Proben überexprimiert (Agoff et al., 2000). Singer et al. (1998) detektierten das Enzym in der Mukosa von CU-Patienten in den luminalen Saumzellen und den mononukleären Zellen der Lamina propria. Eine verstärkte COX-2-Expression im Vergleich zu Normalgewebe wurde auch von Roberts et al. (2001a) in den Entzündungszellen der Lamina propria, in myenterischen neuronalen Zellen, glatten Muskelzellen und im Epithel beschrieben.

Vergleicht man die COX-2-Muster im Epithel der Kolitisproben im Entzündungsgrad 3 mit denen in Tumorproben, so sind Ähnlichkeiten zwischen frühen hyperplastischen Läsionen und den Entdifferenzierungsgraden G1 und G2 zu erkennen. Die COX-2-Muster im Stroma sind mit denen in stärker entdifferenzierten sporadischen Tumoren vergleichbar. Im Stroma waren sowohl mobile als auch fixe Zellen COX-2 positiv. Eine genaue Zuordnung des Zelltyps wäre durch zusätzliche Doppelmarkierungsexperimente möglich.

Das COX-1-Muster weist in entzündetem Gewebe eine ähnliche Verteilung wie die COX-2 auf. Mit Zunahme des Entzündungsgrades ist das Enzym in seiner perinukleären Lokalisation im Epithel in der ursprünglichen Lokalisation kaum noch nachweisbar. Zusätzlich tritt jedoch ab Entzündungsgrad 2 im Epithel einzelner Proben eine strukturgebundene IR apikal vom Zellkern auf, in einer Lokalisation, wie sie für die COX-2 typisch ist. Diese Enzymfraktion lässt sich mit diesem COX-1-Antikörper auch in einigen Tumorproben nachweisen. Dieser Befund spricht für die Existenz einer induzierbaren Enzymform, die der COX-1 strukturell sehr ähnlich ist, da sie von dem COX-1-Antikörper erkannt wird (siehe auch 5.1.1.1). COX-1 positive Stromazellen nehmen mit zunehmendem Entzündungsgrad signifikant zu, schon im Entzündungsgrad 1 unterscheidet sich der Enzymspiegel deutlich von intaktem Gewebe. Auch in Ulzerationen der Magenschleimhaut wurde eine verstärkte COX-1-Expression in ähnlicher Lokalisation beschrieben (Jackson et al., 2000).

Dass beide Isoenzyme eine wesentliche Rolle bei der Erhaltung der Mukosa-Integrität und im Entzündungsgeschehen spielen, wird auch dadurch belegt, dass die selektive Hemmung von COX-1 oder COX-2 im Rattenmodell nicht ulzerogen ist; die kombinierte Hemmung beider Isoenzyme verursacht jedoch schwere Läsionen der Mukosa (Halter et al., 2001).

5.2.1.2 NOS

CED sind mit einer verstärkten NO-Bildung in der Mukosa assoziiert (Boughton-Smith et al., 1993; Lundberg et al., 1994). NO und seine Redoxprodukte sind wichtige Komponenten der intestinalen Epithelzellantwort auf mikrobiellen Stress (Witthöft et al., 1998). Die iNOS kann in intestinalen Epithelzellkulturen nicht nur durch verschiedene Zytokine sondern auch durch Endotoxin induziert werden (Tepperman et al., 1993). Es wird postuliert, dass NO durch die Bildung von Peroxynitrit über die Reaktion mit Superoxid Zellschäden verursachen kann. Peroxynitrit wiederum reagiert mit Tyrosin und modifiziert durch Nitrotyrosin-Bildung zelluläre Proteine (Marnett et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass die iNOS-Spiegel im Epithel und in den mobilen Zellen positiv mit dem Entzündungsgrad bei CU korrelieren. Im Epithel ist immunreaktives Protein in den bereits für den Normalbefund beschriebenen Strukturen apikal vom Zellkern, besonders im Saume epithel und auch am Kryptengrund, lokalisiert. Im Entzündungsgrad 3 verteilt es sich

entlang der gesamten Krypte. Bereits im Entzündungsgrad 1 ist die iNOS in beiden Zelltypen erhöht. Im Entzündungsstadium 3 erreicht der iNOS-Spiegel ein Niveau, vergleichbar mit dem in Tumorproben mit den Differenzierungsgraden G1-G3.

Diese Ergebnisse zur Verteilung von iNOS auf zellulärer und subzellulärer Ebene stimmen sehr gut mit denen anderer Arbeitsgruppen überein (Singer et al., 1996; Dijkstra et al., 1998; Kimura et al., 1998; Perner et al., 2001). Kimura et al. (1998) zeigten darüberhinaus, dass nicht nur die iNOS Aktivität proportional zum Grad der mukosalen Entzündung zunimmt, sondern auch die Nitrotyrosin-Bildung im Epithel und vorrangig in Zellen der Lamina propria. Die Autoren vermuten, dass die iNOS-Aktivität mit der verminderten Lebensfähigkeit des Epithels assoziiert ist und dass ein NO-Stress bei der chronischen Entzündung eine maligne Transformation in der Mukosa fördert. Dijkstra et al. (1998) vertreten dagegen die Auffassung, dass die Gewebsschädigung während der akuten Entzündung wahrscheinlich eher durch ROS-produzierende Zellen und nicht durch NO hervorgerufen wird. Sie fanden nitrosylierte Proteine ausschließlich in den ROS-bildenden Zellen der Lamina propria in einiger Entfernung von den iNOS-produzierenden Epithelzellen. Die Einwanderung von Neutrophilen ins Epithel entzündeter Gewebe geht ebenfalls mit einer verstärkten Bildung von Superoxid einher, was eher für eine Schädigung der Mukosa durch reaktive Stickstoffspezies als durch NO per se spricht (Perner et al., 2001).

Das iNOS-Muster korreliert auf zellulärer und subzellulärer Ebene im Epithel der entzündeten Mukosa - ebenso wie in humanem Normal- und Tumorgewebe - in beeindruckender Weise mit dem der COX-2 pc. Auch Singer et al. (1998) beschrieben beide Enzyme in ähnlicher subzellulärer Lokalisation. Wechselwirkungen zwischen iNOS und COX-2 sind in der Literatur beschrieben (Landino et al., 1996; Goodwin et al., 1999; Clancy et al., 2000; Kobayashi et al., 2001). So kann NO u. a. die COX-2 in Kolonepithelzellen induzieren (Mei et al., 2000; Liu et al., 2003). Umgekehrt kann aber auch die COX-2 die iNOS in intestinalen Epithelzellen der Ratte regulieren (Kobayashi et al., 2001). Aus der Literatur ist bekannt, dass die transkriptionelle Kontrolle dieser beiden Isoenzyme über die Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionssystems erfolgt (Schottelius und Baldwin, 1999). Marinović (2003) konnte im Rahmen dieser Studie zeigen, dass auch NF- κ B eine ähnliche Verteilungskinetik im Entzündungsprozess zeigt wie diese beiden Isoenzyme. Auch das Verteilungsmuster der PKC- α stimmt im Epithel auf zellulärer und subzellulärer Ebene mit dem der COX-2 und iNOS überein.

Langanhaltende DNA-Schäden durch NO und Sauerstoff-Radikale werden als eine Ursache für das hohe Risiko von CU-Patienten diskutiert, kolorektale Tumore zu entwickeln, deren Genese sich vom Chromosomeninstabilitätsweg unterscheidet. Unter der chronischen oxidativen Schädigung der Dickdarmschleimhaut nimmt die Frequenz von p53-mutierten Zellen zu (Hussain et al., 2000). Die sich ausbildende Aneuploidie führt über eine zunächst

niedriggradige zu einer hochgradigen Dysplasie, aus der sich Kolitis-assoziierte Karzinome entwickeln (Hofseth et al., 2003).

5.2.1.3 *GI-GPx*

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der GI-GPx-Spiegel in der Dickdarmmukosa positiv mit dem Grad der Entzündung bei CED korreliert. Mit zunehmendem Schweregrad der Entzündung steigt der Spiegel der strukturegebundenen GI-GPx-Fraktion im Zytoplasma an, zuerst nur im Saumepithel und im Kryptengrund, später in allen Kryptenkompartimenten. Auch die kernständige Fraktion des Enzyms erhöht sich mit zunehmendem Entzündungsgrad und breitet sich in Richtung Lumen aus. Zusätzlich ist die GI-GPx in den Proben von CU-Patienten in schwach diffus zytoplasmatischer Lokalisation in den unteren Kryptenkompartimenten zu finden, ebenfalls verstärkt im Entzündungsgrad 3.

Die GI-GPx-Muster im Entzündungsgrad 3 ähneln denen in frühen Entdifferenzierungsstadien von Tumoren. Das Enzym ist mit fortschreitender Entzündung auch strukturegebunden im Zytoplasma einzelner Stromazellen der Lamina propria und Tela submucosa nachweisbar.

Sowohl die strukturegebundene Enzymfraktion im Zytoplasma als auch die kernständige sind im Entzündungsgrad 1 schwächer als in morphologisch intaktem Gewebe ausgeprägt; zusätzlich tritt die GI-GPx schwach diffus im Zytoplasma verteilt auf. Ob diese Unterschiede durch die unterschiedliche Probenzusammensetzung aus Kolon und Rektosigmoid bedingt sind oder ein spezifisches Charakteristikum des Entzündungsstadiums 1 und 2 darstellen, muss anhand einer größeren Probenanzahl geklärt werden. Da das Kontrollgewebe von Patienten mit sporadischen kolrektalen Tumoren stammt, könnte dieser Befund auch bedeuten, dass der GI-GPx-Spiegel bei Tumorpatienten bereits in histologisch unverändertem Gewebe ansteigt. Die Erhöhung der GI-GPx-Spiegel mit zunehmender Entzündung ist als ein protektiver Effekt einzuschätzen, denn homozygote GI-GPx/cGPx-Doppel-knockout-Mäuse entwickeln eine Kolitis, die dem Krankheitsbild der humanen CU entspricht (Esworthy et al., 2001).

Es wird angenommen, dass die Fähigkeit der GI-GPx, transkriptionell auf einen Redoxstress zu reagieren, von größerer physiologischer Relevanz ist als die posttranskriptionelle Regulation, die von der Selenverfügbarkeit abhängt (Kelner et al., 2000). Dieser Interpretation entspricht, dass, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, im Verlauf der Kolitis die Verteilung der strukturegebundenen GI-GPx-Fraktion im Epithel positiv mit der der COX-2 pc und iNOS korreliert.

5.2.1.4 15-LOX

Im Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann festgestellt werden, dass die 15-LOX-1-Spiegel positiv mit dem Grad der Entzündung bei der CU korrelieren. Das Enzym tritt auch in den Proben von CU-Patienten ausschließlich in den mobilen Zellen der Lamina propria und Tela submucosa auf, sowohl diffus verteilt als auch strukturgebunden im Zytoplasma. Proben mit dem Entzündungsgrad 1 weisen bereits höhere 15-LOX-1-Spiegel auf, als morphologisch intakte Proben. Auch bei der CU wird das Enzym nach ersten Ergebnissen von Doppelmarkierungsexperimenten hauptsächlich in den eosinophilen Zellen exprimiert (Dr. Gräbner, persönliche Mitteilung).

Der 15-LOX-2-Spiegel erhöht sich ebenfalls mit zunehmendem Grad der Entzündung. Dabei war die Zunahme in den Stromazellen der Lamina propria und z. T. auch der Tela submucosa stärker ausgeprägt als im Epithel. Die Lokalisation im Zytoplasma war sowohl diffus als auch strukturgebunden. Insgesamt war der 15-LOX-2-Spiegel auch im Entzündungsgrad 3 im Epithel geringer als bei Hyperplasien und im Stadium G1 bei FAP-Patienten. Im Gegensatz zur FAP tritt das Enzym bei der CU eher in den unteren Kryptenvierteln als im luminalen Kryptenbereich auf. In der Literatur gibt es bisher keine Befunde zur Lokalisation der 15-LOX-Isoenzyme bei CED. Es ist jedoch belegt, dass die Bildung von 15-HETE aus Arachidonsäure in Kolonbiopsien von CU-Patienten proportional zum histologischen Grad der Entzündung ansteigt (Zijlstra et al., 1992). 15-HETE hat starke antiinflammatorische Eigenschaften und hemmt die LTB₄-Bildung (Herlin et al., 1990). Von 15-HPETE ist bekannt, dass es in der Lage ist, die COX in geringen Konzentrationen zu stimulieren und in hohen Konzentrationen zu inhibieren (Warso und Lands, 1983).

Fasst man die Befunde der immunhistochemischen Untersuchungen zusammen, kann festgestellt werden, dass mit zunehmendem Grad der Entzündung die COX-1, COX-2 pc, iNOS, GI-GPx und 15-LOX-2 verstärkt im Epithel exprimiert werden. In den Stromazellen betrifft es zusätzlich COX-2 mc, 15-LOX-1 und in geringerem Maße GI-GPx.

Auch für den MC konnte eine ähnliche zelluläre und subzelluläre Verteilung von COX-2 pc, iNOS und GI-GPx im Verlauf des Entzündungsprozesses nachgewiesen werden.

5.2.2 Vergleichende Untersuchungen am TNBS-Kolitismodell der Ratte

Die Kolitis wurde bei der Ratte durch einen einmaligen Einlauf mit dem kontaktsensibilisierenden Allergen TNBS induziert. TNBS wirkt dabei als lokale Noxe. Nach einer anfänglichen unspezifischen Entzündungsreaktion folgt eine klassische, T-Zell-vermittelte Immunreaktion vom verzögerten Typ. Die Immunreaktion wird durch Bindung des Haptens Trinitrophenol an Autoantigene erklärt (Elson et al., 1995, 1996). Die immunologische Reaktion ist Th1-Zell-vermittelt und hat damit große Ähnlichkeit zum MC

(Dohi et al., 2000; Holtmann, 2002). Charakteristisch für CU ist dagegen eine Aktivierung der Th2-Zellen.

Die Tiere entwickeln eine kurzzeitige akute Kolitis, die den vollständigen Verlust der mukosalen Gewebeschicht in den betroffenen Arealen zur Folge hat. Innerhalb der folgenden 21 Tage kommt es nahezu zur vollständigen Regeneration. Das Modell spiegelt somit nur begrenzt die Persistenz chronischer Störungen wider, die für CED charakteristisch sind. Untersuchungen wurden am Tag vor (0) und am Tag 4, 11 und 21 nach der Kolitis-Induktion vorgenommen. Bedingt vergleichbar mit entzündlichen Veränderungen bei der CED des Menschen sind die Tage 4 und 11. Dabei entspricht der 4. Tag einer akuten Entzündung. Am 11. Tag ist diese bereits abgeschwächt und die Regeneration erfassbar. Am 21. Tag wird in der Mehrzahl der Fälle morphologisch und histologisch nahezu das Ausgangsstadium erreicht. Histologisch und immunhistochemisch wurde nur Gewebe aus dem Randbereich der Entzündung untersucht, da dieses morphologisch am ehesten der Situation der CED beim Menschen entspricht. Außerdem ist die Mukosa, die direkt mit der Noxe in Kontakt kommt, stark nekrotisch und deshalb für immunhistochemische Untersuchungen ungeeignet.

Bei der Bewertung des Entzündungsgeschehens hat sich der entwickelte Score, der neben histologischen und morphologischen auch klinische Parameter einbezieht, bewährt.

5.2.2.1 COX

Die COX-2 pc ist vor der Kolitisinduktion nur vereinzelt in Zellen des Saumepithels, apikal vom Zellkern, vorhanden. Das entspricht qualitativ den Befunden im intakten humanen Dickdarm; allerdings tritt das Enzym im Epithel der Ratte seltener auf. Am Tag 4 und 11 der TNBS-Kolitis waren im Gegensatz zur humanen Kolitis keine wesentlichen Veränderungen des COX-2 pc-Spiegels im Epithel festzustellen. In Übereinstimmung mit den humanen Kolitisproben war jedoch die COX-2 pc in den mobilen Zellen der Lamina propria und der Tela submucosa am Tag 4 und in geringerem Maße am Tag 11 erhöht. Insgesamt waren aber nur wenige Zellen COX-2 positiv.

Die mit dem monoklonalen Antikörper erhobenen Befunde stimmen auf zellulärer und subzellulärer Ebene vor der Kolitisinduktion sehr gut mit den Befunden an humanen Dickdarmproben überein. Auffällig war, dass die COX-2 mc IR im TNBS-Modell deutlich schwächer als im DMH-Modell ausgeprägt war. Ob dieser Befund durch einen direkten DMH-Einfluss bewirkt wird, muss geklärt werden.

Am Tag 4 und 11 sind die Befunde zur COX-2 mc-Verteilung mit denen der humanen Kolitisproben vergleichbar. Die COX-2 mc positiven Zellen im Epithel (wahrscheinlich infiltrierende Zellen) nehmen ab und die in der Lamina propria und Tela submucosa zu. Ebenso wie beim Menschen wurde eine Häufung von COX-2 mc positiven Zellen am

luminalen Rand von Ulzerationen beobachtet. Deutlich erhöhte COX-2 mRNA-Spiegel waren am Tag 4 und in geringerem Maße am Tag 11 auch in Zellen der Lamina muscularis mucosae, der Tunica muscularis und des Plexus myentericus nachweisbar.

Insgesamt sind die COX-1-Spiegel sehr gering und niedriger als die der COX-2. Vor der Kolitisinduktion entsprach die zelluläre Verteilung und die subzelluläre Lokalisation gut der von intakten humanen kolorektalen Proben. In der akuten Entzündung sind die wenigen COX-1 positiven Zellen im Epithel nicht mehr nachweisbar, verstärkt treten aber COX-1 positive Zellen in der Lamina propria, der Tela submucosa und dem Plexus myentericus auf. Dies befindet sich ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Befunden bei CU. Eine COX-1 IR apikal vom Zellkern der Epithelzellen, wie sie bei der CU auftritt, konnte bei der Ratte nicht beobachtet werden.

Die in dieser Arbeit ausgewiesenen Ergebnisse zur COX-2-Expression decken sich mit den Befunden von Reuter et al. (1996). Sie fanden in der akuten Phase eine verstärkte COX-2 mRNA- und Protein-Expression, die im Verlauf der Heilung wieder abnahm. Während der Entzündung wiesen sie das Enzym in den Zellen der Lamina propria, der Tela submucosa, den glatten Muskelzellen der Lamina muscularis und im Endothel, nicht jedoch in den neuronalen Zellen des Plexus myentericus, nach. Die Autoren gehen davon aus, dass die im Entzündungsprozess wirkenden Prostaglandine hauptsächlich durch die COX-2 gebildet werden. Sie fanden auch COX-1 positive Zellen in der Entzündung. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, konnten sie aber keine wesentliche Veränderung der COX-1-Expression bei der TNBS-Kolitis beobachten. Im IL-10^{-/-}-Maus-Kolitismodell wurde ebenfalls eine verstärkte COX-2-Expression in ulzerierten Regionen, nicht jedoch in den Epithelzellen, beschrieben (Shattuck-Brandt et al., 2000).

Weder COX-1^{-/-}- noch COX-2^{-/-}-Tiere entwickeln eine spontane gastrointestinale Entzündung (Morteau et al., 2000); nur ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Kolitis-Induktion wird gesteigert. Dieser Effekt ist stärker bei homozygoten COX-2- als bei COX-1-Tieren ausgeprägt. Eine experimentelle Kolitis lässt sich auch durch exogene Prostaglandine abschwächen. Umgekehrt können Indomethazin u. a. NSAIDs durch Hemmung der Prostaglandinsynthese eine akute und chronische Enterokolitis induzieren (Allgayer et al., 1989). Aber auch über einen protektiven Effekt von selektiven COX-2-Hemmern bei der chemisch-induzierten Kolitis wird berichtet (Cuzzocrea et al., 2001; Kankuri et al., 2001b; Khan et al., 2002). Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang wahrscheinlich der Zeitpunkt der Hemmung der COX-2 im Verlauf des Entzündungsgeschehens.

Insgesamt lässt sich einschätzen, dass sowohl die COX-2 als auch die COX-1 einen wesentlichen Schutzeffekt auf die Mukosa ausübt, der der akuten Entzündung vorbeugt. So kann COX-2 z. B. die pathologische zelluläre Immunantwort auf luminalen Bakterienantigene unterdrücken (Morteau, 1999). Auch auf Grund der in dieser Arbeit beobachteten

stadienabhängigen zellulären Lokalisation der COX-Isoenzyme innerhalb ulzerierter Areale sowohl bei CU als auch bei experimenteller Kolitis kann vermutet werden, dass beide Isoenzyme die Wundheilung fördern (Powell et al., 1999).

5.2.2.2 NOS

Die Rolle von NO in der Pathophysiologie entzündlicher Darmerkrankungen wird kontrovers diskutiert. Auch in diesem Tiermodell lässt sich im Kontrollgewebe eine schwache konstitutive Expression der iNOS feststellen. Sie tritt nur sporadisch, hauptsächlich in den Saumzellen auf und entspricht damit den Befunden beim Menschen. In der Akutphase der Kolitis ist sie im Epithel nicht nachweisbar; erst am Tag 21 entsprechen die Befunde wieder dem Ausgangsstadium. Demgegenüber tritt beim Menschen mit zunehmendem Entzündungsgrad eine signifikante Erhöhung der iNOS-Spiegel im Epithel auf. In Übereinstimmung mit den Befunden bei CED-Patienten nimmt die iNOS-Expression jedoch in den mobilen Zellen von Lamina muscularis mucosa und Tela submucosa in der Akutphase in Gebieten mit starker Granulozyteninfiltration signifikant zu. Die vorgestellten Befunde zur iNOS-Expression stimmen sowohl vor Kolitisinduktion als auch im Verlauf der folgenden zwei Wochen gut mit den Arbeiten von McCafferty et al. (1999) über die TNBS-Kolitis in der Maus überein. Dort fanden sich in der akuten Phase ebenfalls ein starker Anstieg der iNOS mRNA und gehäuft iNOS immunreaktive Zellen. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Neutrophile, seltener um Makrophagen. In iNOS-defekten Tieren ist die Entzündung in der Akutphase signifikant stärker ausgeprägt als bei Wildtyp-Tieren. Deshalb wird angenommen, dass die verstärkte iNOS-Expression in den Leukozyten einen Schutzeffekt in der Akutphase bewirkt, aber keinen Einfluss auf den späteren Verlauf der TNBS-Kolitis hat. Knockout-Modelle wurden für alle drei NOS-Isoformen konstruiert, aber nur der Verlust der induzierbaren Form führt zum Verlust der Immunfunktion (Tamir und Tannenbaum, 1996).

Demgegenüber sind die Ergebnisse in Tiermodellen nach Anwendung von NOS-Hemmstoffen kontrovers. Es wurde sowohl von einer Abschwächung, keinen Effekten, aber auch über eine Verstärkung der experimentell induzierten Kolitis berichtet (Rachmilewitz et al., 1995; Pfeiffer und Qiu, 1995; Dikopoulos et al., 2001; Kankuri et al., 2001a). Eine Erklärung für die unterschiedlichen beobachteten Effekte könnte sein, dass sich nur eine vollständige Hemmung der iNOS nachteilig auswirkt, dagegen eine geringe iNOS-Aktivität in der akuten Phase der Entzündung für essentielle Funktionen, wie z. B. die Abwehr von Bakterien, von Bedeutung ist.

Yue et al. (2001) fanden nach TNBS-Gabe eine verstärkte iNOS-Aktivität, aber eine verminderte Aktivität der konstitutiven NOS (cNOS). Sie vermuten, dass die iNOS eine andere Rolle in der Kolitis spielt als die cNOS und dass die Erhaltung der cNOS-Aktivität für den Schutz des Kolongewebes vorteilhaft ist. Die eigenen Befunde belegen auf Grund der

zellulären Lokalisation der iNOS und nNOS und dem Enzym-Verhalten im Verlauf der Kolitis ebenfalls eine unterschiedliche Rolle dieser beiden Isoformen im Dickdarm.

Die nNOS wird in der Mukosa der Ratte konstitutiv, besonders stark im Saumepithel und den Epithelzellen am Kryptengrund, exprimiert. In der akuten Phase der Kolitis und auch am Tag 11 wird der nNOS-Spiegel in den unteren 3 Kryptenvierteln des stark proliferierenden Epithels hochreguliert. Zusätzlich treten am Tag 4 auch vereinzelt nNOS positive mobile Zellen auf. Die zelluläre und subzelluläre Verteilung des Enzyms in der akuten Phase stimmt sehr gut mit dem iNOS-Muster im Epithel bei CU überein.

Die Hemmung der cNOS zeigt schädliche Effekte auf die Mukosa des Rattenkolons (Laszlo und Whittle, 1997). Nichtselektive NOS-Hemmer könnten somit auch die nNOS und dadurch wahrscheinlich die Epithelregeneration in diesem Modell hemmen und die Entzündung verstärken.

5.2.2.3 *GI-GPx*

Das GI-GPx-Muster im Dickdarm der Ratte entspricht vor Kolitisinduktion auf zellulärer Ebene dem in intaktem humanen kolorektalen Gewebe. Im Gegensatz zum Menschen tritt die GI-GPx auch in diesem Modell im distalen Kolon nicht in einer strukturgebundenen Fraktion im Zytoplasma auf. In der akuten Phase der TNBS-Kolitis wird, ähnlich wie in der akuten Phase bei der CU, der GI-GPx-Spiegel hochreguliert. Die Anzahl von Zellen mit einer kernständig verteilten GI-GPx-Fraktion nimmt in luminaler Richtung zu. Auch die Konzentration der diffus zytoplasmatisch verteilten Enzymfraktion steigt am Kryptengrund und in der luminalen Kryptenhälfte an. Diese stark GI-GPx positiven Regenerationszonen sind durch eine erhöhte Proliferation gekennzeichnet (Ki-67 IR, Befunde nicht gezeigt). Weder in der Phase der akuten Entzündung noch in der Phase der Regeneration konnte dagegen eine strukturgebundene Lokalisation des Enzyms im Epithel nachgewiesen werden. Die diffus zytoplasmatische Lokalisation entspricht jedoch in ihrer Gewebsverteilung der strukturgebundenen Enzymlokalisation beim Menschen im Verlauf der Kolitis. Wie bei CU tritt das Enzym in der akuten Phase im TNBS-Modell vereinzelt auch in Stromazellen auf. Zu diesem Zeitpunkt ist das Enzym, ähnlich wie die COX-2, auch in Zellen des Plexus myentericus exprimiert.

cGPx und GI-GPx weisen die größten Peroxid-reduzierenden Aktivitäten im Epithel des Gastrointestinaltraktes auf (Esworthy et al., 2001). Sie üben eine zytoprotektive Wirkung auf die Dickdarmschleimhaut aus, die insbesondere pathogene Einflüsse durch die intestinale Mikroflora verhindert. Diese Aussage lässt sich ableiten, weil cGPx/GI-GPx-Doppelknockout-Mäuse nicht unter keimfreier Haltung, aber in Gegenwart der intestinalen Mikroflora innerhalb von sieben Tagen eine Kolitis ausbilden. Die Mikroflora induziert im Kolon eine

Expression von GI-GPx, aber nicht von cGPx (Esworthy et al., 2003). Dieser Befund unterstreicht die Schutzfunktion der GI-GPx.

Die Kolitis homozygoter cGPx/GI-GPx-Doppel-knockout-Mäuse ist durch perianale Läsionen, Entzündungen der Mukosa im Ileum und Kolorektum mit Kryptenabszessen und entzündlichen Zellinfiltraten charakterisiert. Typisch ist weiterhin ein verminderter Muzingehalt, seltener eine gestörte Kryptenarchitektur. Die Entzündung geht mit einer erhöhten Aktivität der Myeloperoxidase und Lipidhydroperoxid-Spiegeln, sowie Wachstumsverzögerung und Hyperthermie einher (Esworthy et al., 2001).

Aufgrund der normalen Verteilung der GI-GPx im Kryptenepithel ist ableitbar, dass die GI-GPx das Epithel sowohl luminal als auch am Kryptengrund vor oxidativer Schädigung schützt. Trotzdem weisen weder GI-GPx noch cGPx homozygote Mäuse Abnormalitäten auf. Aber cGPx^{+/-}/GI-GPx^{-/-}-Doppel-knockout-Mäuse sind anfälliger für eine Kolitis als cGPx^{-/-}/GI-GPx^{+/-}-Mäuse. Das deutet darauf hin, dass cGPx teilweise eine fehlende GI-GPx-Expression kompensieren kann, aber nicht vice versa. Da die GI-GPx nur etwa ein Drittel der spezifischen Aktivität der cGPx besitzt, der homozygote Verlust der GI-GPx aber schwerwiegendere Folgen als der der cGPx hat (Esworthy et al., 2001), muss die GI-GPx noch andere Funktionen haben. Sowohl die cGPx (Tham et al., 1998) als auch die GI-GPx sind im Dickdarm der Maus im Saumepithel exprimiert. Nur die GI-GPx ist auch im Kryptengrund exprimiert (eigene Daten, nicht gezeigt). Dieses Verteilungsmuster lässt darauf schließen, dass die Funktion der GI-GPx am Kryptengrund essentiell ist.

Das Verhalten des GI-GPx-Spiegels im Verlauf der TNBS-Kolitis unterstützt die Schlussfolgerung, dass das Enzym bei der Regeneration des Epithels und der Wundheilung eine wichtige Rolle spielt, denn stark proliferierendes, die Ulzeration schließendes Epithel, ist durch hohe GI-GPx-Spiegel mit einer kernständig und zytoplasmatischen Verteilung charakterisiert.

5.2.2.4 15-LOX

Die 12-LOX/15-LOX-1 konnte bei der Ratte weder vor Induktion noch im Verlauf der Kolitis detektiert werden.

5.2.2.5 HSP25

Die Induktion von HSPs wird auch durch pathogene Mikroorganismen der intestinalen Mikroflora und deren Produkte sowie Zytokine, z. B. IL-2, stimuliert (Nishiyama et al., 2001). Kleine Hitzeschockproteine wie das HSP25 haben eine Chaperon-Funktion (Jakob et al., 1993). HSP25 wird im TNBS-Modell unter physiologischen Bedingungen konstitutiv in den Gefäßwänden, in fixen und mobilen Zellen der Lamina propria, Zellen der Muskelschichten

und im Plexus myentericus exprimiert. Diese Ergebnisse entsprechen den eigenen Befunden am DMH-Modell und Literaturangaben (Wilkinson und Pollard, 1993; Wakayama und Iseki, 1998). In der akuten Phase der Kolitis waren verstärkt größere HSP25 positive Gefäße in den ulzerierten Arealen nachweisbar. In direkter Nachbarschaft zu diesen Gebieten wiesen auch Zellen der Lamina muscularis mucosae, der Tunica muscularis und des Plexus myentericus am Tag 4 und in geringerem Maße am Tag 11 höhere HSP25-Spiegel auf. In der Lamina propria dagegen wurden HSP25 positive Zellen erst am 21. Tag wieder festgestellt.

Im Gegensatz zu Literaturangaben (Ren et al., 2001) und den Befunden am DMH-Modell waren im TNBS-Modell im Verlauf der Kolitis zu keinem Zeitpunkt HSP25 positive Epithelzellen nachzuweisen. Wahrscheinlich tritt dieser Effekt nur im distalen Kolonabschnitt auf, so dass bei der TNBS-Ratte HSP25 positive Epithelzellen nicht erfasst wurden, da die Proben weiter proximal entnommen wurden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass, in Übereinstimmung mit der CU, im Kolitismodell in der akuten Phase ebenfalls erhöhte GI-GPx-Spiegel im Epithel vorliegen. Unterschiede bestehen jedoch hinsichtlich der subzellulären Lokalisation bei Mensch und Ratte. Auch die nNOS liegt in dieser Phase verstärkt im Epithel vor, ihre Lokalisation entspricht dabei der der iNOS bei der CU. Im Gegensatz zur CU tritt in der Phase der akuten Entzündung weder eine Verstärkung der COX-2 noch der iNOS im Epithel der Ratte auf. Eine bessere Übereinstimmung zwischen Tiermodell und CU findet sich im Hinblick auf die Stromazellen. So sind bei der TNBS-Kolitis COX-2 (mc, pc), COX-1 und iNOS verstärkt in den Stromazellen nachweisbar, zusätzlich auch HSP25.

Das TNBS-Kolitismodell spiegelt somit eine Anzahl pathologisch wichtiger Veränderungen wider, welche den schwersten Entzündungsgrad sowohl bei CU als auch bei MC charakterisieren. Das TNBS-Modell kann deshalb als geeignet zur Prüfung protektiver Ernährungsstrategien eingeschätzt werden.

5.2.3 Einfluss von RS Typ III auf den Verlauf der TNBS-Kolitis der Ratte

SCFA haben zytoprotektive Eigenschaften und einen positiven Effekt auf die Wundheilung (Sellin, 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Gabe einer butyrogenen RS III - hergestellt aus einem *in vitro* synthetisierten α -1,4-Glukan - der Entzündungsverlauf im TNBS-Modell weniger stark als in der Kontrollgruppe ausgeprägt ist. Sowohl der klinisch-makroskopische als auch der mikroskopische Entzündungsscore zeigten eine abgeschwächte Entzündungsreaktion am Tag 4 und 11. Unter der RS-Diät waren im

histologischen Schnitt im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängerte Krypten, gesteigertes Kryptbranching, ein erhöhter Becherzellgehalt und eine vermehrte Muzinbildung zu beobachten. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe am TNBS-Modell mit einer RS III aus Erbsenstärke. Die Regeneration der Schleimhaut setzt ebenso wie die Normalisierung der Kontrolle von Proliferation und Apoptose unter RS III früher ein (Jacobasch et al., 1999).

Die abgeschwächte Entzündungsreaktion im TNBS-Modell unter der RS III-Diät geht mit erhöhten Spiegeln an SCFA, besonders an Butyrat, einher (Jacobasch und Schmiedl, 2002). Außerdem werden unter dieser Diät vermehrt Gallensäuren ausgeschieden und vermindert zytotoxische sekundäre Gallensäuren im Dickdarmlumen gebildet (Rössler, 2002a).

Butzner et al. (1996) wiesen im TNBS-Modell der Ratte nach, dass tägliche Klysmen mit 100 mM Butyrat die Wundheilung der Mukosa stimulieren. Sie fanden eine verminderte Entzündungsreaktion, verbesserte klinische Parameter und eine Wiederherstellung der SCFA-stimulierten Elektrolyt-Resorption. Auch Segain et al. (2000) wiesen nach 100 mM Butyratklysmen eine verminderte Entzündungsreaktion und eine verbesserte Wundheilung der Mukosa nach. Im Natrium-Dextransulfat (DSS)-Kolitismodell der Ratte zeigten Butyrateinläufe einen signifikanten Schutz gegen eine Verstärkung der Mukosapermeabilität und die Infiltration mit polymorphonukleären Zellen (Venkatraman, 2003). Gegenzug berichteten demgegenüber Tarrerias et al. (2002). Sie konnten nach Butyratgabe keine Verminderung einer TNBS-induzierten Überempfindlichkeit beobachten.

An intestinalen Biopsieproben und isolierten mononukleären Zellen der Lamina propria von Patienten mit MC konnte gezeigt werden, dass Butyrat die TNF-Produktion und die proinflammatorische Zytokin-mRNA-Expression vermindert. Butyrat hebt außerdem die Lipopolysaccharid-induzierte Expression von Zytokinen durch periphere mononucleäre Blutzellen und die Translokation von NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern auf (Segain et al., 2000). NF- κ B ist ein Target in der Therapie der CED. Die Entwicklung und Anwendung von NF- κ B-Hemmern stützt sich auf die Tatsache, dass sie selektiv auf pro- aber nicht antiinflammatorische Zytokine einwirken (Bondeson et al., 1999). Es wird vermutet, dass die Hemmung von NF- κ B durch Butyrat über die Histon-Hyperacetylierung erfolgt, da auch Trichostatin A, ein Hemmer der Histon-Deacetylase, die gleichen Effekte auf NF- κ B hat (Inan et al., 2000). Weitere antiinflammatorische Effekte von Butyrat sind dokumentiert (Williams et al., 2003).

Der Einfluss von RS III auf die TNBS-Kolitis spiegelt sich nicht nur im histologischen Bild sondern auch im veränderten Expressionsmuster einzelner entzündungsassoziierter Enzyme wider.

Die deutlichsten Unterschiede in der Verteilung im Epithel unter RS-Diät zeigt die GI-GPx. Die kernständige und auch die diffus zytoplasmatische Enzymfraktion sind am Tag 4, in der

akuten Phase, signifikant vermindert, an den übrigen Tagen tendenziell erhöht. Diese Befunde deuten auf eine abgeschwächte Entzündungsreaktion in der akuten Phase und eine bessere Redoxhomöostase im Heilungsprozess unter RS hin.

Signifikant vermindert ist auch die Anzahl COX-2 mc positiver Zellen in der Lamina propria am 11. Tag. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass auch die PKC- δ und NF- κ B in den Zellen der Lamina propria am Tag 4 und Tag 11 unter RS vermindert vorliegen. Auch war die kernständige NF- κ B-Fraktion tendenziell vermindert. Im Epithel führt RS zu einem Anstieg der zytoplasmatischen PKC- δ -Fraktion (Marinović, 2003).

Weiterhin ist der nNOS-Spiegel am 11. Tag tendenziell verringert. Auf das Verhalten der COX-1, COX-2 pc und iNOS übt RS III keine signifikanten Effekte aus. Eine Akkumulation von HSP25 im Saumeepithel, wie sie im DMH-Modell unter RS III nachgewiesen wurde, tritt bei der TNBS-Kolitis nicht auf.

In Anbetracht der Vielgestaltigkeit der morphologischen Veränderungen und der geringen Tierzahl haben nicht alle Ergebnisse die Kraft, statistisch signifikant zu sein. Aber sie sind als tendenziell zu bewerten.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass durch Gabe einer mit 10 % RS III angereicherten Diät der Entzündungsverlauf einer TNBS-Kolitis abgeschwächt und die nachfolgende Regeneration beschleunigt wird. Ein solcher Effekt sollte langfristig, durch Stabilisierung der Remissionsphase, auch das Risiko der kolorektalen Tumorbildung vermindern. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine vollständige Unterdrückung der Tumorbildung im kolorektalen Tumormodell der DMH-Ratte mit RS III erreichbar ist.

Diese Befunde unterstreichen, dass eine Anreicherung der Nahrung mit RS III eine erfolgversprechende Strategie ist, um die Remission bei CED zu stabilisieren und die Bildung kolorektaler Karzinome sowohl bei CED-Patienten als auch bei anderen Risikogruppen zu senken.

Die Ergebnisse der tierexperimentellen Arbeiten sind in der Perspektive zusätzlich durch klinisch kontrollierte Studien mit Risikopatienten zu ergänzen.

In einem Pilotversuch wurden Patienten mit CU über einen Zeitraum von drei Jahren mit täglich 15 g RS III behandelt. Erste Befunde dieser Studie sprechen dafür, dass RS die Remissionsphase bei CU stabilisieren kann.