

## 1 Einleitung

### 1.1 Kolorektale Karzinogenese

Kolorektale Karzinome zählen zu den Malignomen, die in den letzten 25 Jahren die höchste Inzidenz-Steigerung aufweisen. Befunde epidemiologischer Untersuchungen legen einen kausalen Zusammenhang zu verändertem Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten nahe. Derzeit werden in Deutschland jährlich 53000 Neuerkrankungen registriert. Damit nimmt das kolorektale Karzinom in der Erkrankungshäufigkeit den ersten Platz ein, gefolgt von Mamma- und Lungenkarzinomen. Parallel zur erhöhten Erkrankungshäufigkeit steigt die Mortalität trotz verbesserter therapeutischer Maßnahmen an (Boese-Landgraf, 1998).

Kolorektale Karzinome sind multifaktoriell bedingte Erkrankungen. In ihrer Ätiologie spielen neben Genmutationen und Polymorphismen auch Umweltfaktoren eine Rolle. In der gesunden Darmschleimhaut befinden sich die Proliferation der Zellen und ihr geregelter Zelltod, die Apoptose, in einem Fließgleichgewicht. Bei der Tumorentwicklung geht diese Kontrolle durch Hemmung der Apoptose verloren und resultiert in unkontrolliertem Wachstum.

Primäre Ursache von Karzinomen sind sequentielle somatische Mutationen in bestimmten Genen von Körperzellen oder Mutationen in Genen der Keimbahn. Somatische Mutationen sind am häufigsten und können Ausgangspunkt einer sporadischen Tumorbildung sein. Kommt es durch eine dieser Mutationen zur Veränderung der Funktion eines kritischen Gens, führt dies zur Entstehung eines Zellklons, der gegenüber benachbarten Zellen einen Wachstumsvorteil aufweist (Wittekind, 1995). Nachfolgende Mutationen in anderen Genen bewirken eine kaskadenartige klonale Expansion, wodurch die Zellen neben Wachstumsvorteilen noch zusätzliche Fähigkeiten erwerben. So gelingt es ihnen z. B. durch einen Abbau der extrazellulären Matrix in die umliegenden Gewebe einzudringen, die Basalmembran zu durchbrechen und sich über das Blut- und Lymphsystem in anderen Geweben des Körpers anzusiedeln. Dieser Prozess ist durch Veränderungen in einer Vielzahl von zellulären Funktionen charakterisiert, die auf Grund ihrer Komplexität bisher nur teilweise aufgeklärt sind. Die Eingrenzung kritischer Genloci wird dadurch erschwert, dass fast ein Drittel des humanen Genoms in Tumoren instabil und in die Karzinogenese involviert ist. Erschwerend kommt hinzu, dass viele tumorassoziierte Gene keine detektierbaren molekularen Läsionen aufweisen. So zeigen sie u. a. einen Verlust der Expression, der nicht aus Mutationen sondern aus Hypermethylierungen von Promotoren resultiert.

Bisher sind mehr als 10 Tumorsuppressorgene identifiziert worden, welche meistens eine strenge Zell- und Gewebsspezifität aufweisen. Die Initiierung von epithelialen Tumoren scheint am häufigsten mit Mutationen in Tumorsuppressorgenen assoziiert (Vogelstein und

Kinzler, 1993). Sie bilden die Grundlage der erblichen Disposition für verschiedene Tumore beim Menschen und werden heterozygot vererbt. Eine zweite Mutation im anderen Allel führt dann zur Inaktivierung des Gens.

Die Anzahl der bekannten dominanten Onkogene ist mindestens zehn mal größer als die der Tumorsuppressorgene. Es wird angenommen, dass nur einige von ihnen an der Tumorgenese beteiligt sind. Durch Amplifikationen, Translokationen und Punktmutationen werden die Protoonkogene in Onkogene überführt. Der daraus resultierende Funktionsgewinn wirkt dominant. Generell können Mutationen zur Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (Bishop, 1991). Das Onkogen c-K-ras und die drei Tumorsuppressorgene APC, DCC und p53 sind immer an der kolorektalen Karzinogenese beteiligt (Ilyas et al., 1999).

### 1.1.1 Sporadische kolorektale Karzinome

Die molekulare Karzinogenese ist ein komplexer Prozess. Ein chromosomaler Instabilitätsweg (CIN) kennzeichnet ca. 80 % der kolorektalen Tumore. Sie sind durch Aneuploidie und chromosomale Instabilität charakterisiert. Zellen von CIN-Tumoren zeigen eine schnelle Akkumulation von Mutationen. Die Rate der Zunahmen oder Verluste ganzer Chromosomen ist 10 bis 100 mal höher als bei normalen Zellen. Man nimmt an, dass die primäre Ursache von CIN-Mutationen Gene betrifft, die, wie Bub1, an der Kontrolle der Mitose beteiligt sind.

Ein weiterer molekularer Mechanismus der kolorektalen Karzinogenese ist durch Mikrosatelliteninstabilität (MIN) charakterisiert (Ionov et al., 1993). Betroffen sind DNA-Reparaturgene, die wesentlich zur korrekten DNA-Replikation und Stabilität des Genoms beitragen. Mutationen in diesen strukturell und funktionell hochkonservierten Genen führen zu kolorektalen und anderen epithelialen Tumoren (Fishel und Kolodner, 1995). Bei den Mutationen handelt es sich überwiegend um somatische Deletionen von Di- und Trinukleotidrepeats, die sich in Introns oder zwischen Genen befinden und nur in Ausnahmefällen kodierende Sequenzen umfassen (Ross et al., 1993). Es wird angenommen, dass im menschlichen Genom ca. 50000 bis 100000 (CA)<sub>n</sub>-Repeats vorkommen. In ihnen treten häufig spontane Replikationsfehler auf (Weber und Wong, 1993). Mikrosatelliteninstabilitäten wurden bei 80 bis 90 % der hereditären nicht polypösen kolorektalen Tumore und bei etwa 12 % der sporadischen kolorektalen Tumore nachgewiesen (Aaltonen et al., 1994; Kim et al., 1994). MIN-Tumore weisen mehr als 100000 Mutationen in verschiedenen Mikrosatellitenloci auf. Daraus resultiert die Annahme, dass die primäre Ursache ein Defekt in der DNA-Replikation ist (Ionov et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in Mismatchreparaturgenen zu 100- bis 700-fach gesteigerter DNA-Strang-Instabilität bei Hefen und E. coli führen (Strand et al., 1993). Für

das Genom des Menschen wurden bisher neun Mismatchreparaturgene beschrieben: hMLH1 (Chromosom 3p21-23), hMSH2 (2p22-21), hMSH6 (2p21), hPMS1 (2q31-q33), hPMS2 (7q22), hMSH5, hMSH3, hMSH4 und hMLH3 (14q24.3) (Bronner et al., 1994; Fishel et al., 1993; Leach et al., 1993; Papadopoulos et al., 1994; Lin et al., 1998). Als wichtigster Marker zur Erkennung von DNA-Fehlern gilt hMSH2 (Peltomaki, 2001).

Der Prozess der Entdifferenzierung vom kolorektalen Adenom zum invasiven Karzinom ist mit Mutationen in mindestens 4 Signalwegen assoziiert: der Wnt/Catenin-Signalkaskade, dem K-ras-Weg, dem p53- und dem TGF- $\beta$ -Weg (Ilyas et al., 1999).

Mutationen in K-ras-Onkogenen weisen bis zu 50 % aller sporadischen kolorektalen Tumore auf. K-ras-Proteine aktivieren die MAP-Kinase-Signalkaskade und sind damit an der Expression verschiedener Gene beteiligt (Bos et al., 1987).

Mutationen im p53-Gen markieren den Übergang vom Adenom zum Karzinom (Lane, 1992). p53 ist auf dem Chromosom 17p lokalisiert und hat u. a. essentielle Aufgaben in der Aktivierung der Apoptose. So kann es durch Aktivierung des p21- und gADP45-Gens einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirken (Polyak et al., 1997) und geschädigten Zellen eine DNA-Korrektur vor Erreichen der S-Phase ermöglichen. Anderenfalls initiiert p53 durch Aktivierung des bax-Gens die Apoptose (el-Deiry et al., 1994).

Häufig treten bei kolorektalen Karzinomen auch Veränderungen im TGF- $\beta$ -Weg auf. Sie äußern sich entweder in einer Inaktivierung von SMAD4 (18q-Verlust) oder durch Mutationen des TGF- $\beta$ -TypII-Rezeptors (Markowitz, 2000).

Neben Mutationen im APC-Gen wurden auch Mutationen im  $\beta$ -Catenin- und Axin-Gen beschrieben. All diese Mutationen bewirken eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern (Korinek et al., 1997). Freies  $\beta$ -Catenin interagiert mit Mitgliedern der Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren-Familie, wodurch ein aktiver Transkriptionsfaktor-Komplex gebildet wird (Behrens et al., 1996). Dieser Komplex kann Protoonkogene aktivieren.

Das in dieser Arbeit verwendete 1,2-Dimethylhydrazin (DMH)-Tumormodell der Ratte weist ebenfalls  $\beta$ -Catenin- und K-ras-Mutationen auf (Blum et al., 2001; Tucker et al., 2003; Llor et al., 1991).

### 1.1.2 Hereditäre kolorektale Karzinome

Bei hereditären Tumorerkrankungen wird, im Unterschied zur sporadischen Karzinogenese, die primäre Mutation in heterozygoter Form über die Keimbahn vererbt. Nachfolgende Mutationen initiieren die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms (Knudson, 1971). Bisher sind zwei hereditäre Formen, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), gut charakterisiert. Eine erheblich geringere klinische Bedeutung haben die hamartomatösen Polyposen (Caspari et al., 2000).

### 1.1.2.1 *Familiäre adenomatöse Polyposis*

Die FAP ist eine obligate Präkanzerose und wird autosomal dominant vererbt. Ursache der Erkrankung sind Mutationen im *apc*-Gen, das auf dem Chromosom 5q21 lokalisiert ist (Grodin et al., 1991). Die Mehrzahl der Mutationen bewirkt einen vorzeitigen Translationsstopp mit Synthese eines verkürzten APC-Proteins. Die Erkrankungshäufigkeit liegt in den Industrieländern bei 1:13000 Einwohnern. Es lässt sich eine Geno-Phänotypen-Korrelation ableiten. Mutationen im distalen und proximalen Gen, z. B. im Codon 158 oder 1903, manifestieren sich durch einen abgeschwächten Krankheitsverlauf. Im Gegensatz dazu entwickeln Patienten mit Mutationen zwischen Codon 1250 und 1330 eine massive Polyposis mit bis zu mehr als tausend Polypen (van Es et al., 2001). Im Allgemeinen lassen sich Adenome ab dem 2. Lebensjahrzehnt nachweisen. Mit durchschnittlich 36 Jahren ist mit dem Auftreten von Kolonkarzinomen zu rechnen (Bulow, 1986). Die klassische Ausprägung der FAP zeigt mehr als 100 kolorektale Adenome, mit einer steigenden Anzahl von proximal nach distal. Es existieren abgeschwächte Formen, die weniger Adenome in einer atypischen Verteilung aufweisen und bei denen die Karzinomentwicklung später einsetzt (Lynch et al., 1995). 80 % der FAP-Patienten entwickeln zusätzlich Adenome im Dünndarm, bevorzugt im Bereich der Papilla Vateri (Kadmon et al., 2001). Bei mehr als der Hälfte der Patienten entstehen auch Magenpolypen, selten Adenome und Karzinome.

Die Erkrankung ist durch verschiedene extraintestinale Manifestationen charakterisiert. Bei Trägern von *apc*-Gen-Mutationen downstream von Exon 9 wird eine kongenitale Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels (CHRPE) gefunden (van Es et al., 2001). Des Weiteren treten Zahnabnormalitäten, Osteome, Lipome, Epidermiszysten, Hepatoblastome, Medullablastome, papilläre Schilddrüsenkarzinome und Desmoide auf (Fearnhead et al., 2001).

Die Diagnostik erfolgt bei Risikofamilien mittels molekularbiologischer Verfahren. Trägern von *apc*-Genmutationen wird ein FAP-Vorsorgeprogramm empfohlen.

### 1.1.2.2 *Hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome*

Die Prävalenz der HNPCC liegt bei etwa 2-10 % (Evans et al., 1997). Der Erbgang ist autosomal dominant mit einer Penetranz von maximal 80 % bis zum 75. Lebensjahr. Keimbahnmutationen in verschiedenen Mismatchreparaturgenen sind die primäre Ursache der Erkrankung. 50 bis 60 % aller Mutationen betreffen das *hMLH1*-Gen, 38 % das *hMSH2*-Gen, etwa 9 % das *hMSH6*-Gen, 1-2 % das *hPMS2*- und *hMLH3*-Gen und weniger als 1 % das *hPMS1*-Gen. Auch bei diesem Krankheitsbild treten extrakolonische Manifestationen wie Malignome am Magen, Pankreas, Endometrium, an den Gallenwegen und im Harntrakt auf (Watson und Lynch, 1993). Das Erscheinungsbild einer HNPCC unterscheidet sich nicht von

dem sporadischer kolorektaler Karzinome. Zur Diagnostik der HNPCC werden die „Amsterdamer Kriterien“ empfohlen: 1. Erkrankung von drei Personen in einer Familie, darunter ein Patient Verwandter ersten Grades, 2. Auftreten der Erkrankung in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen, 3. Diagnose von mindestens einem kolorektalen Karzinom vor dem 50. Lebensjahr, 4. Ausschluss einer FAP, 5. extrakolonische Tumorbildungen (Vasen et al., 1993, 1999). Es treten muzinöse und wenig differenzierte Karzinome auf. 40 % der Patienten entwickeln 10 Jahre nach subtotaler Kolektomie ein zweites kolorektales Karzinom. Trotzdem lässt sich für HNPCC-Patienten eine bessere Prognose ableiten als für Patienten mit FAP. Trägern von Mutationen in Mismatchreparaturgenen wird ein Vorsorgeprogramm empfohlen, das alle 3 Jahre eine Koloskopie und ein HNPCC-Screening umfasst (Young et al., 2001).

## 1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) haben seit den 40er Jahren international stark zugenommen. Prävalenz und Inzidenz zeigen große regionale Unterschiede (Mendeloff, 1988). In Deutschland gibt es derzeit ca. 300000 Patienten (Duchmann, 1999).

Der Begriff CED fasst verschiedene Krankheitsbilder unterschiedlicher Genese zusammen (Eil und Raithel, 1998). Der Morbus Crohn (MC) ist durch eine Entzündung bevorzugt im terminalen Ileum und Colon ascendens charakterisiert. Es können aber auch alle Abschnitte des Gastrointestinaltraktes befallen sein. Typisch für den MC sind perianale Läsionen mit Fistelbildungen, längs gestellte Ulzera und die Bildung epitheloidzelliger Granulome und Aphten. Die Rezidivrate ist hoch.

Bei der Colitis ulcerosa (CU) tritt die Entzündung fast immer zuerst im distalen Dickdarm auf und breitet sich unterschiedlich stark nach proximal aus. Bei der Mehrzahl der Patienten ist der Krankheitsverlauf intermittierend. Charakteristisch sind blutige und schleimige Diarrhöen. Die Blutungsneigung ist hoch und resultiert aus einer starken kapillären Vaskularisierung der Dickdarmschleimhaut. Fistelbildungen sowie perianale Läsionen treten bei der CU nur selten auf. Extraintestinale Manifestationen werden an Gelenken, Haut, Augen, Leber, Gallenwegen, seltener an Niere, Lunge und Pankreas beobachtet.

1980 wurde die mikroskopische Kolitis als eine weitere Form der CED beschrieben (Read et al., 1980). Kennzeichnend für dieses Krankheitsbild ist die Diskrepanz zwischen dem relativ unauffälligen makroskopischen und auffälligen mikroskopischen Befund. Die kollagene Kolitis ist durch diffuse, diskontinuierliche Verdickungen der subepithelialen Kollagenschicht charakterisiert, die sich, bevorzugt bei Frauen, im proximalen Dickdarm ausbilden. Das entzündliche Infiltrat in der Lamina propria setzt sich überwiegend aus Lymphozyten und Plasmazellen zusammen, die epithelialen Läsionen sind abgeflacht.

Die lymphozytäre Kolitis weist keine verbreiterte Kollagenschicht auf. Das entzündliche Infiltrat ist bei dieser Erkrankung dichter als bei der kollagenen Kolitis. Charakteristisch ist das Auftreten von Mastzellen.

Als Pouchitis wird eine Form der Kolitis bezeichnet, die sich bei Patienten mit einer ileoanalen Pouch-Anastomose ausbilden kann. Für FAP-Patienten ergibt sich am häufigsten die Indikation für eine Proktokolektomie und Anlage einer ileoanalen Pouch-Anastomose (Parks und Nicholls, 1978; Taylor und Dozois, 1987). Eine Pouchitis entwickelt sich allerdings bei CU-Patienten häufiger als bei FAP-Patienten. Auch die Prävalenz für eine weitere CED, die intestinale „Behçet’s Disease“, ist in den letzten Jahren gestiegen. Typisch für diese Erkrankung sind häufig wiederkehrende Gewebsschädigungen im Gastrointestinaltrakt, an Haut, Gelenken und Augen sowie neurologische Befunde. Im Gastrointestinaltrakt geht die Manifestation mit Diarrhöen, Blutungen und abdominalen Schmerzen einher. Es treten tiefe Ulzerationen auf, die bevorzugt im Ileum und Zökum lokalisiert sind (Gurler, 1997; Zouboulis, 1997).

### 1.2.1 Ursachen der CED

CED sind multifaktorielle Erkrankungen, in deren Entstehung genetische Faktoren, Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora, Mikrozirkulations- und Resorptionsstörungen in der Darmmukosa, Veränderungen im Immunsystem, sowie Belastungsfaktoren, zu denen Infektionen, Schadstoffe und die Ernährung zu zählen sind, involviert sind (Foitzik et al., 1999; Sanderson et al., 1992; Ekbohm et al., 1996; Satsangi et al., 1996a, 1996b; Naom et al., 1996; Plevy et al., 1996; Futami et al., 1995; Andus et al., 1997; Cho et al., 1998; Swidsinski et al., 2002).

Vergleichende Untersuchungen an Zwillingen lieferten erste Hinweise für eine genetische Disposition. Die Prävalenz ist bei eineiigen Zwillingen höher als bei zweieiigen. Die Konkordanzraten liegen bei eineiigen Zwillingen für die CU bei 6-16 %, für den MC bei 20-24 %. Kürzlich wurde auf dem Locus IBD1 des Chromosoms 16q12 das NOD2-Gen identifiziert (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Bei Subtypen von Patienten mit MC wurden ca. 30 verschiedene Mutationen am C-terminalen Ende dieses Gens nachgewiesen. Das NOD2-Protein wird ausschließlich in Monozyten exprimiert. Strukturell entspricht es den R-Proteinen in Pflanzen, die die Wirtsresistenz gegenüber mikrobiellen Pathogenen vermitteln. Von funktioneller Bedeutung ist, dass NOD2 eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bewirkt (Ogura et al., 2001). Über die Konsequenzen dieser Mutationen bestehen bisher nur Vermutungen. Für drei Varianten konnte gezeigt werden, dass dadurch die Fähigkeit zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung und damit auch die Abwehr bakterieller Infektionen verloren geht, die über die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors initiiert wird. Das könnte eine Prädisposition zur Aktivierung des mukosalen Immunsystems sein.

Weitere genetische Loci, die das Risiko zur Ausbildung einer CU erhöhen, wurden auf den Chromosomen 12q13, 6p13, 19p13, 1p36, 7q und 3p beschrieben (Bonen und Cho, 2003). Von besonderem Interesse ist die Region 7q, wo das *mdr1*-Gen (multidrug resistance 1) lokalisiert ist. Das Produkt dieses Gens, ein Phosphoglykoprotein, wird in den intestinalen Zellen stark exprimiert und ist ein Bestandteil der Barriere gegen Xenobiotika. *mdr1a*-knockout-Mäuse entwickeln eine Kolitis, die der CU entspricht (Panwala et al., 1998). Beim Menschen geht ein Nukleotidpolymorphismus des *mdr1* in Position C3435T mit einer verminderten Phosphoglycoproteinexpression einher (Schwab et al., 2003b). Träger des Genotyps 3435TT zeigen eine gestörte Barrierefunktion und haben ein gesteigertes Risiko zur Ausbildung einer CU. Das *MUC3*-Gen ist ein weiteres Kandidatengen auf diesem Chromosom. Es kodiert ein Muzinglykoprotein im Dünn- und Dickdarm (Gendler und Spicer, 1995). Polymorphismen einer Anzahl von Tandemrepeats in diesem Gen sind ebenfalls mit einem gesteigerten CU-Risiko verbunden (Kyo et al., 1999).

Die Annahme, dass Umweltfaktoren in der Ätiopathogenese der CED von Bedeutung sind, stützt sich darauf, dass die Erkrankungshäufigkeit bei Asiaten nach der Auswanderung in Industriestaaten zunimmt und sich die Inzidenz für MC zwischen 1950 und 1960 in den meisten Ländern Europas verdoppelte, wobei sich ein Nord-Süd-Gefälle entwickelte (Shivananda et al., 1996).

Die Prävalenzen für CU reichen von 80 bis 157, die Inzidenzraten liegen zwischen 1,5 und 25 pro 100000 Einwohner. Die Prävalenz für MC variiert von 27 bis 106. Die Inzidenz liegt zwischen 0,8 und 9,8 (Hugot et al., 1999).

Die großen Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit sind sowohl durch geographische als auch durch ethnische und zeitabhängige Variationen bedingt. In Europa beträgt die Inzidenz für die CU gegenwärtig 5,6 und für MC 10,4 (Shivananda et al., 1996). Der Zeitpunkt der Zunahme der Erkrankungshäufigkeit für CED fällt zusammen mit der Einführung der nichtsteroidalen antiinflammatorischen Pharmaka (NSAIDs) und der Antibiotika. Ein zeitlicher Bezug lässt sich ebenfalls zu Veränderungen im Ernährungsverhalten herstellen, so mit einer erhöhten Aufnahme von raffinierten Zuckern und Fett sowie einer verminderten Ballaststoff-Zufuhr. Eine nicht ausreichende Deckung des Kohlenhydratbedarfs der Mikroflora verändert das Fließgleichgewicht der apathogenen Mikroflora. Pathogene Mikroorganismen können sich ansiedeln. Dadurch werden die bestehenden Wechselwirkungen zwischen der intestinalen Mikroflora und der Dickdarmschleimhaut gestört, Matrixproteine werden geschädigt, eine Beeinträchtigung der Barrierefunktion resultiert. Auf die Barrierefunktion des intestinalen Epithels wirken eine Vielzahl von Verbindungen ein. Dazu zählen proinflammatorische und immunogen wirksame Substanzen, die im Darmlumen gebildet werden, z. B. FMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin),

Peptidglykane, Lipopolysaccharide, Toxine mit Proteaseaktivität, sekundäre Gallensäuren, Abbauprodukte von Gallensäuren und Medikamente (Jacobasch und Dongowski, 2000).

Es sind zwei Wege bekannt, über die pathogene Bakterien die Dickdarmschleimhaut schädigen können: Mikroorganismen binden am apikalen Pol des intestinalen Epithels oder bewirken eine invasive Zerstörung des Epithels. Enterotoxisch wirksame *E. coli*, wie z.B. *ETEC*, zählen zu den adhätierenden Mikroorganismen. Zur Kategorie der enteroinvasiven Bakterien werden z. B. *Shigella*, *Salmonella* und *Yersinia* gerechnet. Bei der Translokation der Bakterien durch die epitheliale Darmbarriere lassen sich drei Invasionswege unterscheiden: über M-Zellen, über villöse Epithelzellen und CD-18-abhängig (Wu et al., 1998; Sansonetti, 2002).

Enterotoxine sind in der Lage, unterschiedliche Signalwege in den Enterozyten zu aktivieren. Sie werden über cAMP- und cGMP-abhängige, sowie über  $Ca^{2+}$ - und NO-abhängige Signalsequenzen wirksam. Die Aktivierung der Signalwege kann aber auch durch Porenbildung und Blockierung der Proteinsynthese für das Zytoskelett bewirkt werden (Fasano, 2002). Der Nachweis der Ursache der bakteriellen Pathogenität sowie der molekularen Wechselwirkungen mit Targetzellen des Wirtsorganismus ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

### 1.2.2 Immunregulationsprozesse im Darm

Die Oberfläche des Darmes, ca. 400 m<sup>2</sup>, ist kontinuierlich Antigenen aus der Nahrung und dem Stoffwechsel der Mikroorganismen ausgesetzt. Normalerweise führen diese Kontakte nicht zu pathologischen Veränderungen, da die Darmmukosa des Menschen eine große Anzahl von mononukleären Zellen enthält (MacDonald und Pender, 1998).

Etwa ein Drittel der Zellen, die in der Lamina propria vorkommen, sind T-Zellen. Die phenotypische Verteilung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ähnelt der des peripheren Blutes. Die Mehrzahl der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Lamina propria (LPLs) sind L-Selektin-negativ. 66-69 % von ihnen exprimieren die CD45RO-Isoform des CD45-Moleküls, die mit den memory-like T-Zellen assoziiert ist (MacDonald und Pender, 1998). In Abhängigkeit von ihrem Aktivitätszustand bilden T-LPLs hohe Zytokinspiegel, insbesondere INF- $\gamma$ . Etwa 10 Mal geringer ist die Anzahl der Zellen, die spontan IL-4 freisetzen. IL-5 freisetzende Zellen wurden nicht nachgewiesen (Fuss et al., 1996). Die Stimulation und Aktivierung von T-LPL erfolgt über alternative Stoffwechselwege (z. B. CD2 und CD28 und INF- $\gamma$ ) (Boirivant et al., 1996). Intestinale Zellen bilden auch hohe TGF- $\beta$ - und IL-10-Spiegel, durch die die Immunantwort in der mukosalen Umgebung unterbrochen werden kann.

CU und MC unterscheiden sich hinsichtlich des chronischen Entzündungsprozesses. Für eine genetisch determinierte Dysregulation der Immunantwort des Wirtes gegenüber der Mikroflora in der Pathogenese der CED gibt es erste Hinweise (Fiocchi, 1998).



Die Mehrzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Geweben von Patienten mit CED sind aktivierte mononukleäre Zellen. Sie wandern in die intestinale Mukosa ein, wahrscheinlich auf Grund einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, die in entzündeten Darmabschnitten freigesetzt werden (MacDonald et al., 2000).

Es wird vermutet, dass ein Toleranzverlust gegenüber der intestinalen Mikroflora zur T-Zellaktivierung beiträgt, da regulatorisch wirksame Verbindungen wie TGF- $\beta$ 1 und IL-10 daran beteiligt sind. Die TGF- $\beta$ 1-Aktivität ist auf Grund einer erhöhten Bildung von Smad7, einem Inhibitor der TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktion, vermindert (Monteleone et al., 2001).

T-Zellen der Mukosa von CED Patienten weisen außerdem ein verändertes Apoptoseverhalten gegenüber verschiedenen Stimuli auf, die mit einer Erhöhung des anti-apoptotisch wirksamen Proteins Bcl-2 und einer verminderten Expression des proapoptotisch wirkenden Proteins Bax verbunden sind. Zusätzlich trägt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-3 dazu bei, T-Zellen vor der Apoptose zu schützen, wodurch die Akkumulation von T-Zellen zunimmt.

Entsprechend ihres Aktivitätszustandes synthetisieren T-Zellen große Mengen an Zytokinen, die direkt und indirekt den Entzündungsprozess beeinflussen. Dabei überwiegt bei Patienten mit MC das Zytokinprofil des Th1-Typs, d. h. der INF- $\gamma$ -Produktion. Auch die immunologische Reaktion des in dieser Arbeit untersuchten TNBS-Kolitismodells ist Th1-Zell-vermittelt und hat damit große Ähnlichkeit zum MC. Die Immunantwort der Mukosa von CU Patienten unterscheidet sich von der bei MC. Bei MC-Patienten überwiegt eine humorale Antwort. Mukosale Plasmazellen bilden hohe Immunglobulinspiegel, vor allem IgG1. Außerdem lassen sich eine große Anzahl von Autoantikörpern im Plasma nachweisen. Sie spielen wahrscheinlich bei der extraintestinalen Manifestation der Erkrankung eine Rolle.

Die Expression von INF- $\gamma$  ist bei CU geringer als bei MC. Bei CU-Patienten setzen T-Lymphozyten nach Stimulierung hohe IL-5-Spiegel frei. Die Synthese von IL-12 ist dagegen gering, wahrscheinlich dadurch, dass die Mukosa eine massive Infiltration von aktivierten Makrophagen aufweist.

Beiden Krankheitsbildern ist aber gemeinsam, dass die mukosale Synthese von proinflammatorischen Zytokinen einschließlich IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- $\alpha$  lokal stark erhöht ist. Die Kontrollmechanismen dieser Synthesen sind nur partiell bekannt. Man nimmt an, dass bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- $\kappa$ B, an die Genpromotorregionen binden. NF- $\kappa$ B induziert dadurch die Expression der Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  in Lymphozyten, Monozyten und Epithelzellen des Darmes. Zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems können auch bakterielle Produkte beitragen (Monteleone et al., 2002).

TNF- $\alpha$  stimuliert ebenso wie IL-1 $\beta$  Fibroblasten im Darm, was sich in einer verstärkten Synthese von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) widerspiegelt. Es wurde gezeigt, dass unter diesen Bedingungen Kollagenasen (MMP-1) und Stromelysin-1 (MMP-3) freigesetzt werden,

die ebenfalls zur Schädigung des Gewebes beitragen. Stromelysin-1 hat ein breites Substratspektrum. Es kann Proteoglykane, Laminin, Fibronectin, Kollagen-core-Proteine, nicht helikale cross-gebundene Regionen von Kollagen Typ 4 abbauen. Stromelysin-1 hat folglich ein hohes Potential für die Strukturzerstörung der intestinalen Lamina propia. Große Mengen an Stromelysin treten in der Mukosa von CED-Patienten besonders in der Umgebung von Ulzerationen auf (Louis et al., 2000).

### 1.2.3 Kolitis-assoziiertes kolorektales Karzinom

Kolorektale Karzinome sind die schwerwiegendste und häufigste Komplikation bei länger bestehenden CED, insbesondere bei CU (Fishel et al., 1993). Nach 10-jähriger Erkrankung steigt bei Pancolitis-Patienten das kumulative Risiko um 0,5 bis 1 % pro Jahr an (Gyde et al., 1988).

Für die CU-assoziierte kolorektale Karzinogenese wird ein gesonderter Weg postuliert, bei dem sich zunächst eine niedriggradige Dysplasie ausbildet, die in eine hochgradige übergeht. Aus ihr entwickelt sich das Karzinom. Die Mutationsfolge ist nicht exakt geklärt.

Man vermutet, dass präkanzeröse Veränderungen bei chronischen Entzündungen durch Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen verursacht werden (Tamura et al., 2000). Es wurde nachgewiesen, dass bei CU-Patienten die Expression des p14ARF-Gens im Dickdarm aufgrund einer Hypermethylierung unterdrückt wird (Sato et al., 2002). Dadurch wird die Hemmung des MDM-2-Onkoproteins durch p14ARF aufgehoben und eine kolorektale Tumorbildung initiiert. Einige Befunde deuten darauf hin, dass sowohl Punktmutationen als auch atypische Hypermethylierungen in Tumorsuppressorgenen durch oxidative Effekte, insbesondere Hydroxylradikale, verursacht werden (Babbs, 1990). Probanden mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung kolorektaler Karzinome bilden verstärkt Malondialdehyd-Desoxyguanosin-Produkte (Leuratti et al., 2002). Diese gelten als prämutagene Läsionen, da sie in der DNA Transitionen von Guanin zu Thymin und zu Adenin induzieren.

### 1.2.4 Therapie der CED

Entscheidend für das Therapiekonzept sind Lokalisation und Schwere des Krankheitszustandes und der Krankheitsverlauf.

Die schwere Kolitis ist als lebensbedrohend einzuschätzen. In diesem Fall ist darüber zu entscheiden, ob die Indikation für eine chirurgische Intervention oder die Einleitung einer immunsuppressiven Therapie besteht.

Beim akuten Schub der distalen CU werden 5-Aminosalizylsäurepräparate und Corticosteroide lokal in Form von Klysmen und Suppositorien eingesetzt. Bei ausgedehnter CU im akuten Schub wird die orale Gabe von 5-Aminosalizylaten oder Sulfasalazin

empfohlen. Letzteres zeigt aber stärkere Nebenwirkungen. Bei Therapieversagen oder Unverträglichkeit der Aminosalizylate ist ein systemischer Einsatz von Steroiden gerechtfertigt. Bei steroidrefraktärer CU besteht die Indikation zur Therapie mit schnell wirksamen Immunsuppressiva wie Cyclosporin oder Tacrolimus, um eine Notfallkolektomie zu vermeiden. Ist eine dauerhafte Immunsuppression induziert, so wird schrittweise die orale Cyclosporinbehandlung durch Azathioprin ersetzt. Zur Remissionserhaltung werden langsam wirkende Immunmodulatoren wie Azathioprin oder 6-Mercaptopurin eingesetzt. Für die CU wird in der Regel eine remissionserhaltende Therapie mit 5-Aminosalizylaten empfohlen (Herrlinger et al., 2002). Zur Remissionserhaltung wird auch die Gabe von apathogenen *E. coli Nissle* empfohlen (Kruis, 2001).

Extraintestinale Manifestationen der CU, die bei 24 % der Patienten auftreten, werden ebenso wie die Grunderkrankung therapiert (Monsen et al., 1990).

Für die Therapie des MC werden wie bei der CU Corticosteroide, Aminosalizylate, Immunsuppressiva und Probiotika eingesetzt (Hoffmann und Zeitz, 2002).

### 1.3 Oxidative Schädigung

Die Anpassung des Lebens an den Sauerstoff im Verlauf der Evolution und die Herausbildung der biologischen Oxidation zur zellulären Energiegewinnung über die Atmungskette war mit der Entwicklung einer Folge von Reaktionen verbunden, über die die Elektronen des Wasserstoffs stufenweise auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, ehe Wasser entsteht. Parallel zur oxidativen Phosphorylierung entstehen dabei reaktive Sauerstoffspezies als Zwischenverbindungen, die Schutzsysteme erforderlich machen.

Für die Beseitigung des  $\cdot\text{O}_2^-$  bildeten sich die Superoxiddismutase, für das  $\text{H}_2\text{O}_2$  verschiedene Peroxidasen heraus. Enzyme zur Umsetzung des besonders reaktiven Hydroxylradikals gibt es nicht. Der Organismus versucht deshalb, bereits Vorstufen, die zur  $\cdot\text{OH}$ -Bildung führen, zu entfernen. Der Entaktivierung von Singulett-Sauerstoff dienen niedermolekulare Verbindungen, die vom Organismus mit der Nahrung aufgenommen werden. Dazu zählen z. B. einige Karotinoide, wie das Lycopin. Besonders effektive antioxidative Schutzsysteme gegen reaktive Sauerstoffspezies sind an Thiole, wie das Glutathion, gekoppelt. Ihre Kapazität verhindert unter normaler oxidativer Belastung zelluläre Schäden. Wird jedoch diese oxidative Belastungsfähigkeit überschritten, entsteht oxidativer Stress (Sies, 1985).

Eine Anzahl verschiedener Enzyme kann direkt mit Sauerstoff reagieren. In Abhängigkeit von der Reaktion lassen sich drei verschiedene Typen unterscheiden:

1. Oxidasen: Hierbei ermöglicht Sauerstoff die Dehydrierung der Substrate. Je nachdem, ob dem Substrat ein, zwei oder vier Sauerstoffatome bzw. Elektronen

entzogen werden, entstehen Superoxid-Anionenradikal, Wasserstoffperoxid oder Wasser.

2. Monooxygenasen: Bei diesen Enzymen dient nur eines der beiden Sauerstoffatome der Dehydrierung, das zweite wird dagegen in das Substrat eingebaut.
3. Dioxygenasen: Sie katalysieren Reaktionen, bei denen beide Sauerstoffatome in das organische Substrat eingebaut werden. Dioxygenasen spielen eine wichtige Rolle beim Endabbau des Kohlenstoffskeletts, z. B. beim Abbau von aromatischen Aminosäuren und Polyphenolen. Zu den Dioxygenasen gehören auch die Lipoxygenasen (LOX) und Cyclooxygenasen (COX), deren Verhalten in der kolorektalen Karzinogenese und bei CED in dieser Arbeit untersucht wurde.

### 1.3.1 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind nichthämeisen-enhaltende Enzyme, die den molekularen Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren einlagern, wodurch ein Hydroperoxid entsteht. Eine für den Säugerorganismus wichtige Reaktion, ist die mit Arachidonsäure (5Z, 8Z, 11Z, 14Z-Eikosatetraensäure). Viele der dabei entstehenden Oxygenierungsprodukte üben wichtige regulatorische Wirkungen auf zahlreiche Organe und Gewebe aus. Sie werden als Eikosanoide bezeichnet. Katalysiert durch die LOX entstehen Leukotriene, die aus weißen Blutzellen und anderen Entzündungszellen freigesetzt werden und an der Manifestation von Entzündungen beteiligt sind. Zu den Eikosanoiden zählen auch die Prostaglandine und Thromboxane, die aus der Umsetzung von Arachidonsäure entstehen, die durch Cyclooxygenasen katalysiert wird. Einige Lipoxygenasen reagieren außer mit Arachidonsäure auch mit anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, z.B. der Linolsäure und der  $\alpha$ -Linolensäure.

Durch die Analyse der LOX-Gene wurde die ursprüngliche Annahme, dass für jedes Eikosanoid eine spezifische LOX existiert, widerlegt (Brash, 1999; Kühn und Thiele, 1999; Kühn und Borchert, 2002; Schewe, 2002). Der Mensch verfügt über mindestens 5 verschiedene Lipoxygenasen: die 5-LOX, die 12S-LOX (Plättchentyp), die 12R-LOX (Epidermistyp), die 15-LOX-1 (Retikulozytentyp) und die 15-LOX-2 (epidermal-epithelialer Typ). Sie bilden eine Familie strukturell verwandter Enzyme. Ihre biologischen Funktionen sind bisher nur teilweise, wie z. B. für die 5-LOX, aufgeklärt.

Sowohl Lipoxygenasen als auch Cyclooxygenasen reagieren in der Regel nur mit unveresterten ungesättigten Fettsäuren. Das bedeutet, dass diese erst durch lipidsplattende Enzyme, die rezeptorabhängig aktivierbar sind, kaskadenartig freigesetzt werden müssen.

Die Arachidonsäurekaskade ist von Interesse, da sie Target für eine Reihe von entzündungshemmenden Arzneimitteln ist (Kühn, 1996).

Die 15-LOX-2 unterscheidet sich sowohl molekulargenetisch als auch in der Gewebsverteilung und Reaktionsspezifität deutlich von der 15-LOX-1. Die Übereinstimmung der Primärstruktur der beiden Isoenzyme liegt bei nur 35 % (Brash, 1999). 15-LOX-1 metabolisiert bevorzugt Linolsäure zu 13(S)-HODE, in einem geringeren Maße Arachidonsäure zu 15(S)-HETE oder 12(S)-HETE. Die 15-LOX-1 wird beim Menschen u. a. in den eosinophilen weißen Blutzellen, in den Epithelien der Atemwege, in Adenomen der Prostata und in kolorektalen Karzinomen synthetisiert. In Monozyten und Lungenmakrophagen wird die Expression der 15-LOX-1 durch die Zytokine IL-4 und IL-13 induziert (Nixon und Eling, 2001; Schewe, 2002). Bei der Ratte u. a. Säugern tritt das entsprechende Enzym der enzymatischen Lipidperoxidation als 12-LOX auf. Wie 15-LOX-1 ist sie auch an der Ausbildung atherosklerotischer Blutgefäßschäden beteiligt (Kühn und Chan, 1997).

Die 15-LOX-2 bildet in erster Linie 15(S)-HETE aus Arachidonsäure. 15-LOX-2 mRNA ist in der Prostata, der Lunge, der Haut und der Cornea nachweisbar (Brash et al., 1997). Das murine Analog der humanen 15-LOX-2 ist die 8-LOX (Brash, 1999).

Oxidativer Streß, der mit der Ausbildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS) einhergeht, steht wahrscheinlich auch im Zusammenhang mit der Genese weiterer Erkrankungen, auch des Gastrointestinaltraktes. Freie Radikale können z. B. durch die intestinale Mikroflora gebildet werden (Babbs, 1990). Ein Beispiel dafür ist die Freisetzung von Superoxid und ROS durch den *Enterococcus faecalis* (Huycke et al., 2002). Diese fördern die chromosomale Instabilität und initiieren dadurch die Tumorbildung. Chromosomale Instabilität resultiert aus der gesteigerten Lipidperoxidation durch die Bildung endogener DNA-Addukte. Die genotoxische Carbonylverbindung Malondialdehyd, ein Beiprodukt des Arachidonsäurestoffwechsels, reagiert mit der DNA unter Bildung von Addukten mit Desoxyguanosin, Desoxyadenosin und Desoxycytidin (Marnett, 1994). 1,N<sup>2</sup>-Malondialdehyd-Desoxyguanosin gilt als prämutagene Läsion, durch die eine Transversion von Guanin zu Thymin und eine Transition von Guanin zu Adenin in der DNA induziert wird (Fink et al., 1997). Tatsächlich weisen Probanden mit einem Risiko für kolorektale Tumore eine erhöhte Bildung von Malondialdehyd-Desoxyguanosin-Produkten auf (Leuratti et al., 2002).

Die Aufklärung derartiger Wechselwirkungen ist von besonderem Interesse, da sie durch eine Vielzahl natürlicher Antioxidantien, die mit der Nahrung aufgenommen werden, beeinflussbar sind. Diese Mikronährstoffe werden als „Nutraceuticals“ bezeichnet (Krämer et al., 1997). Als neuer Schwerpunkt der Ernährungsforschung bildet sich das Gebiet der Nutritional Genomics – „Nutrigenomics“ heraus (Trayhurn, 2003).

### 1.3.2 Cyclooxygenasen

Cyclooxygenasen (Prostaglandin-H-Synthasen, PGHS) sind bifunktionale Enzyme, die sowohl Cyclooxygenase- als auch Peroxidase-Aktivität zeigen. Die Cyclooxygenase-Komponente setzt Arachidonsäure mit zwei Molekülen  $O_2$  zu einem Hydroperoxy-endoperoxid (Prostaglandin  $G_2$ ,  $PGG_2$ ) um, die Peroxidase-Komponente reduziert das Hydroperoxid ( $PGG_2$ ) zu dem entsprechenden Alkohol ( $PGH_2$ ), der Vorstufe von Prostaglandinen, Thromboxanen und Prostazyklinen (Smith et al., 2000).

Es existieren mindestens drei Isoformen. Die COX-1 wird konstitutiv in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen, einschließlich Endothel, Monozyten, Blutplättchen, Sammelrohren der Niere und in der Bläschendrüse exprimiert. Die gebildeten Prostaglandine haben Gewebshormonfunktionen und tragen zur Regulation der Homöostase u. a. in der Niere, der Magenschleimhaut und den Gefäßen bei. Das Enzym ist jedoch auch an pathologischen Prozessen, wie der Thrombose, beteiligt (Turini und DuBois, 2002; Smith et al., 2000).

Das Isoenzym COX-2 wird im Gegensatz zur COX-1 in verschiedenen Zellen durch eine Vielzahl von Stimuli, z. B. Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen, mikrobiologischen Faktoren, sowie mechanischen und chemischen Einflüssen induziert. Glucocorticoide, antiinflammatorische Zytokine u. a. unterdrücken die COX-2-Expression (Tsuji et al., 2001). COX-2 ist in die Prostaglandinsynthese bei entzündlichen Prozessen, Schmerzen, Fieber, der Entstehung verschiedener epithelialer Tumore (Kolonrektum, Pankreas, Prostata, Haut, Kopf und Hals, Ösophagus, Brust, Lunge) und der Alzheimer Krankheit involviert. Sie wird in einigen Geweben aber auch konstitutiv exprimiert, so im Gehirn, in den Inselzellen des Pankreas, in den Eierstöcken, dem Uterus und den Nieren (Turini und DuBois, 2002).

COX-1 und COX-2 sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Beide Proteine führen dieselben katalytischen Funktionen aus und haben ähnliche Tertiärstrukturen. COX-1 und COX-2-Polypeptide zeigen 60-65 % primäre Sequenzidentität innerhalb der gleichen Spezies und 85-90 % zwischen Isoformen verschiedener Spezies. Die Hauptsequenzunterschiede zwischen den beiden Isoformen befinden sich in den Membranbindungsdomänen. Die COX-2 enthält eine 18-Aminosäure-Insertion in der C-terminalen Region. Cyclooxygenasen sind Homodimere mit zwei identischen Untereinheiten. Jedes Monomer besteht aus 3 strukturellen Domänen: einer epidermalen Wachstumsfaktordomäne am N-Terminus, einer benachbarten Membranbindungsdomäne und einer großen C-terminalen globulären katalytischen Domäne. COX-1 und COX-2 sind integrale Membranproteine. Sie sind an der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums und an den assoziierten inneren und äußeren Membranen des Zellkerns lokalisiert (Smith et al., 2000). Prostaglandine wirken über Membran-Rezeptoren und nukleäre Rezeptoren, wie z.B. PPAR- $\gamma$  und  $\delta$  (Ota et al., 2002).

Die Rolle der COX-2 in der kolorektalen Karzinogenese ist von großem Interesse, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass die regelmäßige Einnahme von COX-Hemmern, wie Acetylsalizylsäure und anderen NSAIDs, ein geringeres Risiko für die Entwicklung kolorektaler Tumore zur Folge hat (Thun et al., 2002). Tumorgewebe weisen im Vergleich zu benachbartem, nicht-neoplastischem Gewebe erhöhte COX-2-Spiegel auf. Die Expression von COX-2 ist ein frühes Ereignis im Verlauf der Tumorentwicklung und trägt zur Tumorprogression bei. Es wird angenommen, dass Prostaglandine zum Tumorpotential von Epithelzellen beitragen, in dem sie die Apoptose inhibieren, die Angiogenese und die Invasion von Tumorzellen stimulieren, die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix verstärken und die immunologische Antwort unterdrücken (Tsuji et al., 2001; Turini und DuBois, 2002).

Eine verstärkte COX-2-Expression ist auch für CED charakteristisch. Die Einnahme von COX-Inhibitoren kann hier jedoch eine Verstärkung der Erkrankung bewirken. Dies lässt vermuten, dass die Prostaglandine bedeutende antiinflammatorische Mediatoren sind oder dass die COX-Hemmung zu vermehrter Substratverfügbarkeit für andere Stoffwechselwege, wie die Bildung von proinflammatorischen Leukotrienen durch Lipoxigenasen, führt (Turini und DuBois, 2002).

Jüngst wurde ein weiteres Isoenzym, die COX-3, beschrieben (Chandrasekharan et al., 2002). Die COX-3 ist eine Splicevariante des COX-1-Gens. Das Enzym hat ähnliche katalytische und strukturelle Merkmale wie die COX-1 und die COX-2 und ist hochsensitiv gegenüber Acetaminophen und entsprechenden Verbindungen.

### 1.3.3 Stickstoffmonoxid-Synthasen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein hochreaktives, kurzlebiges Radikal, das frei diffundieren kann. 1987 wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Stickstoffmonoxid, vom Gefäßendothel synthetisiert und freigesetzt, eine Relaxation der glatten Muskulatur von Gefäßen bewirkt (Palmer et al., 1987). NO wird aus der terminalen Guanidgruppe des L-Arginins gebildet. Die NO-Freisetzung erfolgt über N-Hydroxy-L-Arginin, das zu NO und Zitrullin gespalten wird. Die Reaktion wird durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert und erfordert als Co-Faktoren  $\text{Ca}^{2+}$ , Calmodulin (CaM) und NADPH. Die aktive Form der NOS ist ein Tetramer, das sich aus 2 NOS-Monomeren und 2 CaMs zusammensetzt. An diesen Komplex sind in der N-terminalen Oxygenasedomäne die Co-Faktoren 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin und Eisenporphyrin IX fest gebunden (Ghosh und Stuehr, 1995). Arginin wird über einen CaM-Bindungsort an der C-terminalen Reduktasedomäne gebunden, die auch die Bindungsstelle für FAD und FMN ist und NADPH enthält.

Drei Isoformen der NO-Synthase sind bekannt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Gewebespezifität und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit (Schmutzer, 2001). Neuronale oder n/bNOS (NOS1) wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert, endotheliale NOS oder eNOS (NOS3) im

Endothel und induzierbare NOS oder iNOS (NOS2) in Entzündungszellen, im Endothel und im Epithel. nNOS und eNOS werden konstitutiv exprimiert und reagieren auf Kalzium-Calmodulin-Signale. Beide Isoformen produzieren NO-Konzentrationen im nanomolaren Bereich mit kurzer Halbwertszeit.

Die iNOS wird durch entzündliche Mediatoren, wie z. B. Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide, induziert. NF- $\kappa$ B, STAT-Transkriptionsfaktoren und AP-1 sind in die transkriptionelle Regulation dieser Isoform involviert. iNOS ist an aktiviertes Calmodulin gekoppelt. Das ermöglicht eine Funktion bereits bei geringen zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln. Die iNOS bildet mikromolare NO-Konzentrationen über längere Zeiträume bis zu mehreren Tagen (Licinio et al., 1999; Nathan und Xie, 1994).

Alle drei NOS-Isoformen sind, abhängig vom Zelltyp, membrangebunden oder auch zytosolisch lokalisiert (Tamir und Tannenbaum, 1996).

Das Signalmolekül NO vermittelt eine Vielzahl von Wirkungen, die sich in Abhängigkeit von der NOS-Isoform und ihrer Gewebslokalisierung unterscheiden. Außer der Vasodilatation bewirkt es eine Neurotransmission, greift in den Eisenstoffwechsel ein und übt im Gastrointestinaltrakt eine Barrierefunktion aus. Die Inaktivierung eines niedrigen physiologischen NO-Tonus im nanomolaren Bereich, z. B. durch freie Radikale, erhöht die Mukosapermeabilität für zytotoxisch wirkende Verbindungen aus dem Darmlumen, für Tumorzellen, Parasiten und Bakterien (Ambs et al., 1998).

Das von der iNOS gebildete NO hat ebenfalls verschiedene physiologische Funktionen. Es ist essentiell für normale Heilungsprozesse in der Haut und der intestinalen Mukosa, hat antimikrobielle Funktionen, inhibiert das Wachstum von Viren, Parasiten und gram-positiven Bakterien, ist wichtig für die Regulation der Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und die Leukozyten-Rekrutierung (Kubes, 2000; Jaiswal et al., 2001).

Eine extensive Bildung von NO durch die iNOS trägt dagegen zu entzündlichen Veränderungen (Appleton et al., 1996) und zur Tumorentstehung bei. NO kann direkt oder über Peroxynitrit DNA-Schäden hervorrufen, die DNA-Reparatur inhibieren, die Apoptose blockieren, die Expression von Onkogenen fördern und Transkriptionsfaktoren modulieren. NO trägt auch zur Angiogenese bei (Tamir und Tannenbaum, 1996; Ambs et al., 1998; Jaiswal et al., 2001; Marnett et al., 2003).

#### 1.3.4 Glutathionperoxidasen

Glutathionperoxidasen (GPx) sind Selenoenzyme, die die Reduktion von Hydroperoxiden in Anwesenheit von Glutathion katalysieren und Peroxide detoxifizieren.

Das aktive Zentrum aller Glutathionperoxidasen besteht aus einer Triade von Selenocystein, Tryptophan und Glutamin (Maiorino et al., 1995). Hier erfolgt die Reduktion von Hydroperoxiden. Dabei wird Selen oxidiert und in nachgeschalteten Schritten durch



Glutathion reduziert. Es entsteht ein Glutathiondisulfid. Über das NADPH-abhängige Flavoenzym Glutathionreduktase wird reduziertes Glutathion regeneriert.

Bisher sind vier Isoenzyme dieser Selen-abhängigen Proteinfamilie bekannt: Die „klassische“ zytosolische Form (cGPx) (Flohé, 1973; Rotruck, 1973), die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) (Ursini et al., 1985), die Plasma Glutathionperoxidase (pGPx) (Takahashi et al., 1987) und die gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx) (Chu et al., 1993). Die Isoenzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität, ihrer Struktur, Lokalisation, Funktion und Regulation.

Im Gastrointestinaltrakt werden alle vier Isoenzyme exprimiert (Brigelius-Flohé, 1999). Die GI-GPx tritt ausschließlich im Gastrointestinaltrakt von Nagern und Menschen auf. Beim Menschen wird sie außerdem in der Leber und der Gallenblase exprimiert. Auch einige Tumorzelllinien weisen das Enzym auf (Chu et al., 1993; Esworthy et al., 1998; Komatsu et al., 2001).

Die GI-GPx reduziert lösliche Fettsäurehydroperoxide, wie Linolsäurehydroperoxide und  $H_2O_2$ . Die Expression der GI-GPx im gastrointestinalen System hat zu der Vermutung geführt, dass dieses Enzym die Resorption von Hydroperoxiden aus dem Darmlumen unterdrückt (Chu et al., 1993; Wingler et al., 2000). Auch gegen endogene Hydroperoxide, die bei pathologischen Prozessen gebildet werden, könnte das Enzym einen Schutzeffekt ausüben. Es wird angenommen, dass das Enzym eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von zellulären Redoxvorgängen spielt. Die GI-GPx rangiert sehr hoch in der Hierarchie der Selenoproteine. Dies lässt auf spezifische Funktionen des Enzyms schließen (Brigelius-Flohé et al., 2001).

#### **1.4 Ballaststoffe / Resistente Stärke als protektive Faktoren**

CED sind mit Veränderungen in der Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikroflora assoziiert, welche Entzündungen initiieren bzw. verstärken und die Darmbarriere beeinträchtigen. Die Stabilisierung des intestinalen Milieus ist ein wichtiger Ansatzpunkt zur Therapie und Remissionserhaltung bei CED. Zusammensetzung und Produktspektrum der intestinalen Mikroflora wird vorrangig durch das Spektrum der Substrate bestimmt, die mit der Nahrung aufgenommen oder als Metabolite vom Wirt in den Darm abgegeben werden. Dadurch wird die intestinale Mikroflora befähigt, eine Toxifizierung und Detoxifizierung von Xenobiotika vorzunehmen, neutrale Sterole und Gallensäure zu transformieren, polyphenolische Verbindungen abzubauen, Abwehrmechanismen gegenüber pathogenen Erregern zu etablieren und ein effektives Immunsystem zu stimulieren (Jacobasch und Schmiedl, 2002).

Die Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikroflora lässt sich durch Pro- und Präbiotika gezielt beeinflussen. Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die zur apathogenen

gastrointestinalen Mikroflora zählen und gesundheitsfördernde Effekte aufweisen (Salminen et al., 1998). Sie werden, zugesetzt zu Nahrungsmitteln, per os aufgenommen. Mutaflor<sup>®</sup> ist ein probiotisches Arzneimittel, das den *E. coli*-Stamm Nissle 1917 enthält. Dieser konkurriert mit den pathogenen *E. coli*-Stämmen um Rezeptorbindungsplätze und unterdrückt dadurch deren toxische Wirkung. Mutaflor<sup>®</sup> wird auch in der Therapie der CED eingesetzt (Kruis, 2001).

Präbiotika sind nicht-verdauliche Nahrungsbestandteile (Ballaststoffe), die selektiv das Wachstum und/oder die Aktivität einer begrenzten Anzahl von Bakterien im Dickdarm stimulieren und dadurch nützliche Effekte auf den Wirtsorganismus ausüben (Gibson und Roberfroid, 1995). Die apathogene Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikroflora wird unter diesen Bedingungen stabilisiert. Die entstehenden Fermentationsprodukte in Form der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) üben positive Effekte auf die Dickdarmschleimhaut aus (Jacobasch und Dongowski, 2000). Um eine ausreichende Substratzufuhr für den Stoffwechsel der intestinalen Mikroflora zu garantieren, wird eine tägliche Aufnahme von mindestens 30 g Ballaststoffen empfohlen (DGE, 2000).

Sehr gut wird Stärke von den dominierenden Gattungen der intestinalen Mikroflora fermentiert. Dabei kommt neben Oligofruktosen sogenannter resistenter Stärke (RS) eine besondere Bedeutung zu, da sie nach Fermentation durch die intestinale Mikroflora hohe Butyrat-Spiegel im Darmlumen liefert. Die kurzkettige Fettsäure Butyrat hat sowohl antineoplastische als auch antiinflammatorische Eigenschaften und ist deshalb für die präventive und therapeutische Beeinflussung pathologischer Veränderungen der Darmschleimhaut von großem Interesse (Jacobasch und Dongowski, 2000; Topping et al., 2003; Williams et al., 2003; Andoh et al., 2003).

Als RS werden Stärke und Stärkeabbauprodukte definiert, die im Dünndarm gesunder Personen nicht gespalten und nicht resorbiert werden (Asp, 1992). In Abhängigkeit von ihrer Struktur lassen sich vier RS Typen unterscheiden. Die größte physiologische Bedeutung kommt dem RS Typ III zu. Dieser RS Typ weist ein partiell kristallines Netzwerk aus mikrokristallinen Filamenten auf, das durch Retrogradation verkleisterter Stärke entsteht. RS III bildet sich während der Abkühlung in geringen Konzentrationen z. B. in gekochten Kartoffeln, Erbsen, Bohnen und Brot aus (Englyst et al., 1992; Jacobasch und Dongowski, 2000).

RS III kommt in natürlichen Lebensmitteln nur in geringen Konzentrationen vor. Ein gezielter Einsatz von RS III in der Ernährung ist deshalb nur mit technologisch gewonnenen RS III-Produkten möglich.

RS Typ III-Produkte lassen sich prinzipiell sowohl aus Amylopektin als auch aus Amylose herstellen. Bestimmend für die angestrebten Qualitätskriterien, wie eine hohe Ausbeute, Temperaturstabilität der resistenten Strukturen und gute Fermentierbarkeit mit hohem

Butyratanteil, ist die Länge der  $\alpha$ -1,4-Glukanketten. Optimale Bedingungen werden bei Glukanketten mit 20 bis 35 Glukoseeinheiten erreicht (Schmiedl et al., 2000).

Zur Realisierung dieser Anforderungen wurden unterschiedliche Verfahren zur RS-Herstellung ausgearbeitet:

1. Gezielte Synthese von  $\alpha$ -1,4-Glukanen bis zur optimalen Kettenlänge aus Saccharose mittels einer Amylosucrase.
2. Enzymatische oder saure Hydrolyse von Amylose zu Stärkehydrolyseprodukten.
3. Spaltung der glykosidischen  $\alpha$ -1,6-Bindungen im Amylopektin durch Pullulanase, vorausgesetzt, die in Clustern vorliegenden Seitenketten entsprechen der notwendigen Kettenlänge.

Durch die Retrogradation derartig entzweigter Stärken wurden RS-Produkte mit hohen Ausbeuten sowohl aus synthetisierten  $\alpha$ -1,4-Glukanen als auch aus Getreide-, Kartoffel-, Bananen- und Erbsenstärken gewonnen (Schmiedl, 1995; Schmiedl et al., 1998, 1999, 2000; Lehmann, 2001; Lehmann et al., 2002, 2003; Jacobasch und Schmiedl, 2002; Rössler, 2002).

Im Handel erhältlich sind u. a. RS Typ III als Novelose 330 und RS Typ II (native granuläre Stärke) als Hylon VII.

Neben Butyrat entstehen als Endprodukte der Fermentation der RS im Dickdarm die SCFA Azetat, Propionat und Valeriat. Bei ballaststoffreicher Ernährung liegen die molaren Anteile für Azetat:Propionat:Butyrat durchschnittlich bei 69:21:10, bei ballaststofffreier bei 92:7:1 (Pomare et al., 1985). SCFA bilden mit 38 % den Hauptteil der Anionen im Dickdarmlumen. Ein Teil der SCFA wird resorbiert und verstoffwechselt, der Rest mit dem Fäzes ausgeschieden. Die Transitzeit im Darm korreliert mit der fäkalen Konzentration der SCFA und der des Butyrats sowie mit dem pH-Wert im distalen Kolon. Butyrat stimuliert über einen enterischen Reflex an den lokalen Sensoren effektiv die Kolonkontraktion. Die aus der Metabolisierung der resorbierten SCFA resultierende Energiebildung ist sehr gering, so dass die zu empfehlende Zufuhr von 15 g RS III pro Tag nicht mit einer energetischen Belastung des Organismus verbunden ist (Jacobasch und Dongowski, 2000).

Von den bei der Fermentation entstehenden kurzkettigen Fettsäuren kommt Butyrat die größte physiologische Bedeutung zu:

1. Butyrat wird von den Kolonozyten als Substrat zum anaeroben ATP-Gewinn genutzt, es ist deren wichtigstes Energiesubstrat (Roediger, 1980).
2. Butyrat stimuliert die Zellteilung am Grund der Dickdarmkrypten und kontrolliert dadurch deren Wachstum und regelmäßige Anordnung in der Dickdarmschleimhaut. Dieser Effekt kommt durch eine Signalwirkung des Butyrats zustande, über die eine Kaskade von

- Phosphorylierungsprozessen aktiviert wird. Durch sie wird die Information in den Zellkern übertragen und durch die Induktion spezifischer Gene der Ablauf des Zellzyklus und Zellstoffwechsels verändert (Scheppach et al., 1992a; Jacobasch und Dongowski, 2000).
3. Butyrat übt einen gesundheitsfördernden Effekt dadurch aus, dass es die Umwandlung von primären zu zytotoxischen sekundären Gallensäuren im Dickdarm hemmt. Es unterdrückt auch die durch Desoxycholat ausgelöste Hyperproliferation (Jacobasch und Dongowski, 2000; Scheppach W., 1997).
  4. Butyrat trägt zur raschen Entgiftung potenziell mutagener Metabolite, die in den Dickdarm gelangen, durch Induktion der intestinalen Glutation-S-Transferase und Hemmung der Ornithindekarboxylase bei (Jacobasch und Dongowski, 2000).
  5. Im Zusammenhang mit CED ist von Interesse, dass Butyrat die Zytokin-Freisetzung nach Stimulierung mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) und Phytohämagglutinin (PHA) sowie die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems hemmt (Nancey et al., 2002; Williams et al., 2003).
  6. Butyrat aktiviert in gesunden Zellen die Proliferation. Befunde an zahlreichen Tumorzelllinien und auch am Modell des metastasierenden kolorektalen Karzinoms in der Ratte belegen, dass Butyrat andererseits das Wachstum von Tumorzellen hemmt und die Apoptose steigert. Butyrat stimuliert Cyclin D1 und p21 und hemmt die Cyclin-abhängige Kinase 2 (Cdk-2)-Expression in kolorektalen Karzinomzelllinien (Velazquez et al., 1996; Perrin et al., 2001; Jacobasch und Dongowski, 2000; Blottiere et al., 2003).
  7. Butyrat unterdrückt Dosis-abhängig die Synthese des in Tumorzellen des Kolon dominierenden vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF165) und übt einen modulierenden Effekt auf den Hypoxy-induzierbaren Faktor (HIF)-1 $\alpha$  aus, der der wichtigste angiogenetische Faktor ist (Pellizzaro et al., 2002).

Im Gegensatz zu Butyratklysmen, für die eine therapeutische Wirkung auf die Kolitis im Tiermodell und in Humanstudien nachgewiesen werden konnte (Butzner et al., 1996; Scheppach et al., 1992b; Scheppach, 1996), besteht der Vorteil einer RS-Gabe darin, dass erstens durch die kontinuierliche Fermentation des Kohlenhydrates der Butyratbedarf der Kolonozyten gesichert, zweitens eine nichtpathogene Mikroflora stabilisiert, drittens durch zusätzliche Bildung von Azetat und Propionat die lokale Durchblutung der Dickdarmschleimhaut gefördert wird und viertens eine orale Zufuhr für den Patienten weniger belastend und ökonomisch vertretbar ist (Jacobasch und Dongowski, 2000).