

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Sitz
Antikörperverdünnungsmedium	Dako	Hamburg
DAB-Substrat-Chromogen System	Dako	Hamburg
DNA-Farbstoff Hoechst 33258	Sigma	Steinheim
N,N'-Dimethylhydrazin-dihydrochlorid (DMH)	Sigma	Steinheim
Eosin	Fluka	Deisenhofen
Hämatoxylin	Merck	Darmstadt
Histomount	Shandon	Frankfurt
Histoplast	Shandon	Frankfurt
Hydromount	Vogel GmbH&Co.KG	Giessen
Methylenblau	Hoechst	Frankfurt
Paraformaldehyd	Sigma	Steinheim
Puffer Mikrowellenbehandlung, ChemMate™	Dako	Hamburg
Schiffs-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
StreptAB-Komplex/POD	Dako	Hamburg
Streptavidin Cy2	Kirkegaard & Perry	Guildford, UK
Tween 20	Sigma	Steinheim
Wasserstoffperoxid, 30 %	Roth	Karlsruhe

Nicht extra aufgelistete Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Sigma (Steinheim) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle verwendeten anorganischen Salze, Säuren, Basen und organischen Lösungsmittel hatten p.a. Qualität.

#### 3.2 Lösungen

PBS, pH 7,4:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , in Aqua dest.
PBST:	PBS 0,2 % (v/v) Tween 20
PFA, pH 7,4:	4 % (w/v) Paraformaldehyd/PBS
Mayers Hämalau aus Hämatoxylin:	1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. lösen, 200 mg Natriumjodat und 50 g Kalialau in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen, 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure dazugeben

Sulfitwasser: 18 ml einer 10%igen wässrigen Lösung von Natriumdisulfit zu 300 ml Aqua dest. mischen, 15 ml N HCL zufügen.

### 3.3 Primärantikörper

Antikörper Anti-	Herkunft, Klonalität	bekannte Spezies- Reaktivität	Produkt- Nr.	Hersteller, Sitz
Calnexin	Kaninchen, pc	Human, Ratte, Maus u.a.	SPA-860D	Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, BC Kanada
β-COP	Maus, mc	Human, Ratte u.a.	G2279	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
COX-1 (C-20)	Ziege, pc	Human, Ratte, Maus	sc-1752	Santa Cruz, Heidelberg
PGHS-2 (Human)	Kaninchen, pc	meisten Säuger- Spezies	PG 27 B	Oxford Biomedical Research, Oxford, Michigan, USA
COX-2	Maus, mc	Human, Maus, Huhn	C22420	Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA
COX-2 (C-20)	Ziege, pc	Human, Ratte, Maus	sc-1745	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
COX-2	Kaninchen, pc	Human, Ratte, Maus, Schaf	160126	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
GI-GPx	Kaninchen, pc	Human, Ratte, Maus		Böcher et al., 1997; zur Verfügung gestellt von Prof. R. Brigelius-Flohé, DIfE, Potsdam
Golgi 58K Protein	Maus, mc	Human, Ratte, Maus u.a.	G2404	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
HSP25	Kaninchen, pc	Ratte, Maus, Hamster, Meerschwein, Rind, Hund	SPA-801	Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, BC Kanada
Ki-67	Kaninchen, pc	Human	A 0047	Dako, Dänemark
Ki-67, MIB-5	Maus, mc	Ratte, Maus, Primaten, Rind, Ziege, Schaf, Schwein, Hund	Dia 5055	Dianova GmbH, Hamburg
15-LOX-1	Meerschwein	Human		zur Verfügung gestellt von Dr. H. Kühn, Charité, Berlin
15-LOX-2	Kaninchen, pc	Human, Maus (8-LOX)	LX 25	Oxford Biomedical Research, Oxford, Michigan, USA

Antikörper Anti-	Herkunft, Klonalität	bekannte Spezies- Reaktivität	Produkt- Nr.	Hersteller, Sitz
iNOS	Kaninchen, pc	Human, Ratte, Maus	NS 01	Oxford Biomedical Research, Oxford, Michigan, USA
iNOS	Kaninchen, pc	aktivierte Maus- Makrophagen	N7782	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
nNOS	Maus, mc	Human, Ziege, Schwein, Ratte	N2280	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
PCNA	Maus, mc	alle Wirbeltiere, Insekten	M 0879	Dako, Dänemark
Trans-Golgi Network 38 (TGN 38)	Maus, mc	Ratte	NB10	Oncogene, Cambridge, MA, USA

mc monoclonal  
pc polyclonal

### 3.4 Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugat	Produkt-Nr.	Hersteller, Sitz
Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)	Biotin-Spacer	711-065-152	Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania, USA
Esel anti-Maus IgG (H+L)	Biotin-Spacer	715-065-150	Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania, USA
Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L)	Biotin-Spacer	705-065-147	Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania, USA
Ziege anti-Meerschwein IgG	Biotin	B5518	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Schaf anti-Kaninchen IgG	Cy3	C-2306	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

### 3.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Sitz
Biopsieschwämme	Engelbrecht	Edermüde
DAKO-Pen	Dako	Hamburg
Deckgläser	Engelbrecht	Edermüde
Druckerpapier (photo quality ink jet paper)	Epson	Japan
Einbettkassetten	Engelbrecht	Edermüde
Filme: Ektachrome Elite II, 400, DX	Kodak	Stuttgart
Microtom-Klingen	Engelbrecht	Edermüde
Objetträger, beschichtet	Engelbrecht	Edermüde

### 3.6 Geräte

Geräte	Typ	Hersteller	Sitz
Blutbildmeßgerät	Technicon H.1E	Technicon Instruments Corporation	Tarrytown, NY, USA
Färbeautomat	Varistain XY	Shandon	Frankfurt
Entwässerungsautomat	Hypercenter® XP	Shandon	Frankfurt
Rotationsmikrotom	HM350	Microm	Walldorf
Paraffinausgießstation	Histocentre 2	Shandon	Frankfurt

### 3.7 Patientengut - Probenmaterial

In Zusammenarbeit mit dem Charité Campus Virchow-Klinikum der HU Berlin, dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin, sowie der onkologischen Schwerpunkt-Praxis Lichtenberg wurde pathologisch verändertes sowie makroskopisch unauffälliges Dickdarmgewebe von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren (Tab. 3-1), mit FAP (Tab. 3-2) sowie CED (Tab. 3-3) entnommen und asserviert. Die Gewebeentnahme erfolgte im Rahmen routinemäßiger klinisch-diagnostischer und/oder therapeutischer Eingriffe mit Zustimmung der Patienten und war Bestandteil von universitär und institutionell geförderten Forschungsprojekten, mit Zustimmung der dortigen Ethikkommission.

Die Zuordnung der Proben erfolgte auf der Grundlage der klinischen Daten unter Beachtung der pathologischen Befunde. Um Veränderungen der Proteinexpression im Verlauf der Entdifferenzierung untersuchen zu können, erfolgte eine Einteilung der Tumorproben in die Differenzierungsgrade G1 bis G4 anhand histomorphologischer Parameter (siehe 4.2.1, Tab. 3-1, 3-2). Für die Klassifizierung der Proben von CED-Patienten wurde ein Kolitis-Score entwickelt, der sich ausschließlich auf histomorphologische Parameter stützt (siehe 4.2.2, Tab. 3-3).

Tab. 3-1: Daten sporadischer kolorektaler Tumore – Patientengut und Proben

P	J	G	PE	Diagnose, Eingriff	Proben-lokalisierung	Proben-anzahl	Grading				
							N	G1	G2	G3	G4
S1	64	m	OP	Karzinom, Hemikolektomie links	Kolon deszendenz	U 1	x				
						U 2	x				
						U 3	x				
						Ka 1				x	
						Ka 2				x	
S2	38	w	OP	Karzinom, anteriore Resektion	Rektum	U 1	x				
						U 2	x				
						U 3	x				
						Ka 1		x		x	
S3	33	w	OP	Karzinom, Hemikolektomie rechts	Zökum	U 1	x				
						U 2	x				
						U 3	x				

P	J	G	PE	Diagnose, Eingriff	Proben-lokalisation	Proben-anzahl	Grading				
							N	G1	G2	G3	G4
S3	33	w	OP	Karzinom, Hemikolektomie rechts	Zökum	Ka 1		x		x	
						Ka 2				x	
						Ka 3		x		x	
						Ka 4				x	
S4	72	w	OP	Karzinom, Hemikolektomie rechts	Kolon aszendenz	U 1	x				
						U 2	x				
						Ka 1					x
						Ka 2	x				x
S5	51	w	OP	Karzinom, anteriore Resektion	Rektum	Ka 3			x		x
						U 1	x				
						U 2	x				
						U 3	x				
S6	79	w	OP	Karzinom, anteriore Resektion	Rektum	Ka 1		x		x	x
						Ka 2		x		x	x
						Ka 3		x		x	x
						U 1	x				
S7	60	m	OP	Karzinom, anteriore Resektion	Rektum	U 2	x				
						U 1	x				
						U 3	x				
						U 4	x				
S8	54	m	KO	Adenokarzinom	Rektum	Ka 1		x		x	
						Ka 2		x		x	
						Ka 3				x	
						Ka 4				x	
S9	67	w	KO	Adenokarzinom	Kolon deszendenz	AKa 1			x		
						AKa 2			x		
S10	74	m	KO	Adenom	Kolon aszendenz	A 1		x			
S11	76	m	KO	Adenom	Kolon deszendenz	A 1		x			

P: Patient  
 J: Alter in Jahren  
 G: Geschlecht  
 PE: Probenentnahme  
 KO: Koloskopie  
 OP: Operation  
 U: makroskopisch unauffälliges Gewebe (klinische Daten)  
 A: Adenom (klinische Daten)  
 AKa: Adenokarzinom (klinische Daten)  
 Ka: Karzinom (klinische Daten)  
 N: histomorphologisch intaktes Gewebe  
 G1-G4: Differenzierungsgrade (siehe 4.2.1)

Tab. 3-2: Daten FAP - Patientengut und Proben

P	J	G	PE	Diagnose	Proben-Lokalisation	Proben-Anzahl	Grading					
							N	D	H	G1	G2	G3
F1	62	m	OP	Adenokarzinom	Rektum	U 1	x	x				
						U 2	x	x	x			
						AKa 1				x	x	x
						AKa 2				x	x	x
F2	40	m	OP	Adenokarzinom	Rektum	AKa1		x	x			
						AKa2			x	x	x	
						AKa3			x	x		
						AKa4			x	x	x	

P	J	G	PE	Diagnose	Proben-Lokalisation	Proben-Anzahl	Grading					
							N	D	H	G1	G2	G3
F3	23	w	OP	Adenokarzinom	Rektum	U 1	x	x				
						U 2	x				x	
						AKa 1					x	
						AKa 2	x				x	
F4	53	m	OP	Adenome	Rektum	U1	x	x	x			
						U2	x	x				
						A1	x			x	x	
						A2	x			x	x	
						A3	x		x	x	x	
						A4	x	x			x	
						A5	x	x	x	x	x	
F5	54	w	KO	Adenom	Rektum	A1		x				
						A2		x				
						A3						x
F6	43	m	KO	Adenome	Rektum	A1					x	
						A2				x	x	
						A3		x				
						A4					x	x
						A5					x	
						A6					x	
						A7					x	
		OP	Adenome	Rektum	U1	x						
					A1	x	x		x	x		
					A2	x	x		x	x		
					A3	x	x		x	x		
					A4	x	x		x	x		
					A5	x	x		x	x		

- P: Patient
- J: Alter in Jahren
- G: Geschlecht
- PE: Probenentnahme
- KO: Koloskopie
- OP: Operation
- U: makroskopisch unauffälliges Gewebe (klinische Daten)
- A: Adenom (klinische Daten)
- AKa: Adenokarzinom (klinische Daten)
- N: histomorphologisch intaktes Gewebe
- D: Dysplasie im Schleimhautniveau
- H: Hyperplasie
- G1-3: Differenzierungsgrade (siehe 4.2.1)

Tab. 3-3: Daten CED – Patientengut und Proben

P	J	G	D	PE	Aktivität der chronischen Entzündung	PL	PA	Grading			
								EG1	EG2	EG3	
<b>Colitis ulcerosa</b>											
C1	21	m	5	OP	akuter Schub	Kolon desz.		1			x
								2			x
								3			x
C2	63	w	o.A.	KO	Remission	Kolon desz.		1		x	
								2		x	
								3		x	
								4		x	
								5	x		
								6		x	
C3	33	m	o.A.	KO	Remission	Rektum		1	x		
								2		x	
C4	34	w	22	KO	Remission	Rektum		1		x	

P	J	G	D	PE	Aktivität der chronischen Entzündung	PL	PA	Grading		
								EG1	EG2	EG3
<b>Colitis ulcerosa</b>										
C5	60	m	27	KO	Remission	Kolon desz.	1		x	
						Rektum	2	x		
C6	51	w	25	KO	Remission	Rektum	1		x	
							2		x	
C7	o.A.	w	o.A.	KO	Remission	Rektum	1		x	
C8	53	w	o.A.	KO	Remission	Zökum	2	x		
						Kolon asz.	3	x		
						Kolon asz.	4	x		
						Kolon desz.	5		x	
						Kolon desz.	6		x	
						Kolon sigm.	7		x	
						Rektum	9		x	
						Rektum	10		x	
						C9	51	m	6	KO
2		x								
C10	75	w	39	KO	Remission	Kolon desz.	1		x	
							2	x		
C11	58	w	4	KO	Remission	Rektum	1		x	
							2	x		
C12 *	25	w	6	KO	Remission	Kolon sigm.	1		x	
							2		x	
C13	69	w	28	KO	Remission	Rektum	1		x	
							2		x	
C14	63	w	6	KO	floride	Rektum	1			x
							2		x	
C15	70	m	7	KO	Remission	Rektum	1	x		
C16 *	65	w	22	KO	mäßig floride	Rektum	1		x	
							2		x	
							2			x
C17	57	m	31	KO	Remission	Rektum	1		x	
C18	65	w	1	KO	Remission	Rektum	1		x	
							2		x	
C19	54	m	9	KO	Remission	Rektum	1		x	
C20 *	52	m	3	KO	floride	Rektum	1			x
							2			x
C21 *	14	w	7	OP	akuter Schub	Kolon desz.	1			x
							2			x
C22	13	w	5	OP	akuter Schub	Kolon asz.	1			x
							2		x	
							3		x	
C23	o.A.	o.A.	o.A.	OP	Remission	Kolon desz.	1		x	
C24	58	m	20	KO	Remission	Kolon desz.	1		x	
							2		x	
C25	55	m	10	OP	akuter Schub	Kolon asz.	1			x
							2		x	
							3			x
							4			x
C26 *	48	w	22	KO	akuter Schub	Kolon transv.	1		x	
							2		x	
C27 *	13	w	8	OP	akuter Schub	Kolon desz.	1			x
							2		x	
							3			x
C28	37	m	8	KO	Remission	Zökum	1		x	

P	J	G	D	PE	Aktivität der chronischen Entzündung	PL	PA	Grading		
								EG1	EG2	EG3
<b>Colitis ulcerosa</b>										
C29 *	37	w	9	KO	Remission	Rektum	1		x	
C30 *	19	m	1	KO	Remission	Zökum	1	x		
						Zökum	2	x		
						Kolon sigm.	3	x		
						Kolon sigm.	4	x		
<b>Morbus Crohn</b>										
M1	43	w	13	KO	mäßiger Schub	Kolon asz.	1	x		
M2	32	w	6	KO	mäßig floride	Kolon transäv.	1		x	
M3	23	m	0	KO	Verdacht auf MC	Kolon	1	x		
							2	x		
M4 **	24	m	2	KO	akuter Schub	Zökum	1		x	
						Kolon transv.	2		x	
						Kolon sigm.	3		x	
						Kolon sigm.	4	x		
M5	60	w	o.A.	KO	mäßiger Schub	Rektum	1		x	
							2		x	
M6 *	26	m	4	OP	akuter Schub	Kolon asz.	1			x
M7	37	w	6	OP	akuter Schub	Kolon asz.	1		x	

P:	Patient	OP:	Operation
J:	Alter in Jahren	PL:	Probenlokalisierung
G:	Geschlecht	PA:	Probenanzahl
D:	Erkrankungsdauer in Jahren	EG1-3	Entzündungsgrad (siehe 4.2.2)
PE:	Probenentnahme	o.A.	ohne Angaben
KO:	Koloskopie		

Fast alle Patienten erhielten eine Dauertherapie mit Aminosalizylaten. Einige Patienten erhielten außerdem Kortikoide (\*) oder Immunsuppressiva (\*\*).

### 3.8 Tierexperimentelle Studien

Um den Präventionseffekt von RS III auf die Tumorentwicklung und den Verlauf entzündlicher Darmerkrankungen zu untersuchen, wurden Experimente am 1,2-DMH-induzierten kolorektalen Tumormodell und dem TNBS-induzierten Kolitismodell der Ratte durchgeführt. Die Tierexperimente fanden im Rahmen von Komplexversuchen (Genehmigungsnummer: Berlin G 0129/98, 28.07.1998) statt. Es wurde eine Vielzahl von Parametern erfasst und analysiert. Die Arbeiten wurden durch ein Drittmittelprojekt von Aventis Research (Industriepark Hoechst, Frankfurt/M.) gefördert.

#### 3.8.1 Haltung und Fütterung der Tiere

Die Tiere wurden bei einem 12 Stunden Licht/Dunkel-Zyklus gehalten. Das jeweilige isokalorisch zusammengesetzte halbsynthetische Spezialfutter wurde in Form von Pellets angeboten. Als Kontrolle diente eine ballaststoffarme Diät mit einem Zellulosegehalt von 5%. Der Anteil der resistenten Stärke in den RS-angereicherten Diäten betrug 10 %. Die RS

wurde im Austausch gegen Stärke in das Futter eingebracht (Tab. 3-4). Fütterung und Trinkwasserzufuhr erfolgten ad libitum.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden Körpergewicht, Nahrungsaufnahme und Trinkmenge kontinuierlich erfasst, sowie Fäzesproben gewonnen.

Tab. 3-4: Futterzusammensetzung

Inhaltsstoffe	Diät		
	DMH / TNBS	DMH	TNBS
	Kontrolle	mit RS	mit RS
	g/100 g TM	g/100 g TM	g/100 g TM
Stärke ◊	<b>63</b>	<b>53</b>	<b>53</b>
Casein •	20	20	20
Sonnenblumenöl °	5	5	5
Zellulose ×	5	5	5
RS III	0	<b>10 a</b>	<b>10 b</b>
Mineralmischung #	5	5	5
Vitaminmischung ≈	2	2	2

◊ Basisstärke: Wachsmaisstärke (National starch and Chemical Company, Bridgewater, USA)

Gehalt an Resistenter Stärke: 0g/100 g

• Dauermilchwerk Peiting GmbH, Landshut, Deutschland

° Thomy GmbH, Karlsruhe, Deutschland

× Rettenmeier GmbH, Ellwangen, Deutschland

**a Novelose 330 (National starch and Chemical Company, Bridgewater, USA), getempert**

**b aus in vitro synthetisiertem  $\alpha$ -1,4-Glukan (Schmiedl et al., 2000)**

# Mineralmischung:	g/kg	≈ Vitaminmischung:	mg/kg
Ca	185,000	Choline	50000,00
P	145,000	Vitamin E	8000,00
K	140,000	p-Aminobenzoic acid	5000,00
Na	88,000	Inositol	5000,00
CL	72,000	Niacin	2500,00
S	34,000	Pantothensäure	2500,00
Mg	16,000	Vitamin B1	1000,00
Fe	4,000	Vitamin B2	1000,00
Mn	2,000	Vitamin B6	750,00
Zn	0,600	Folsäure	500,00
Cu	0,160	Menadione	500,00
F	0,080	Vitamin A	225,00
I	0,008	Biotin	10,00
Se	0,004	Vitamin B12	1,50
Co	0,002	Cholecalciferol	0,65
Altromin GmbH, Lage, Deutschland		Altromin GmbH, Lage, Deutschland	

### 3.8.2 DMH–Tumormodell

#### 3.8.2.1 Versuchsaufbau

20 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Deutschland) mit einem Ausgangsgewicht von 240-280 g wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (K, n=12) erhielt das Kontrollfutter, eine zweite Gruppe (RS, n=8) wurde mit RS III-angereicherter Diät gefüttert (Tab. 3-4).

Zur Tumorinduktion erhielten alle Tiere eine wöchentliche subkutane 1,2-DMH-Injektion von 20 mg pro kg Körpergewicht über 20 Wochen. Die Injektion erfolgte nach kurzzeitiger Äthernarkose und oberflächlicher Desinfektion in die Nackenfalte. Das an HCl gebundene 1,2-DMH wurde zur Injektion in Aqua ad injectabile gelöst, anschließend mit Natronlauge auf pH 6,5 eingestellt. Die Tiere wurden eine Woche vor Beginn der Injektionsperiode auf das jeweilige Spezialfutter umgestellt. Das Futter wurde über die gesamte Versuchsdauer von 21 Wochen verabreicht.

#### 3.8.2.2 Probenentnahme

Nach Beendigung der Versuchsdauer wurden die Tiere ätheranästhesiert dekapitiert. Für die Erstellung der Differenzialblutbilder wurde Blut abgenommen.

Das Zökum und der Dickdarm wurden entnommen, vermessen, gewogen, auf Ausmaß und Schwere makroskopischer Läsionen untersucht und anschließend längs geöffnet. Zökum- und Dickdarminhalt sowie Fäzes wurden für die Metabolit-Analyse aufgearbeitet. Am proximalen und distalen Ende des Dickdarmes wurden jeweils 0,5 cm Darmgewebe entfernt, in eiskaltem PBS gespült und für histologische und immunhistochemische Untersuchungen in 4 % PFA fixiert.

Dünndarm und alle weiteren Organe wurden entnommen, gewogen und Proben in 4 % PFA bzw. bei –80 °C asserviert.

#### 3.8.2.3 Erfassung von Neubildungen

Der längs geöffnete Dickdarm wurde leicht gestreckt und zwischen Filterpapier in 4 %igem PFA fixiert. Nach Anfärbung mit 0,1 % Methylenblau in PBS für 3 min wurde der eröffnete Darm im Stereomikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung auf das Vorhandensein von Neoplasien und aberranten Kryptofoci (ACF) untersucht. Anzahl, Größe und Lokalisation der Tumore wurden erfasst. Die Tumore wurden herauspräpariert und histologisch charakterisiert. Die Auswertung erfolgte im Blindversuch.

### 3.8.3 TNBS-Kolitismodell

#### 3.8.3.1 Versuchsaufbau

Die Studie wurde mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten (n=48, Anfangsgewicht: 301± 25g) durchgeführt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen à 24 Tiere eingeteilt. Die erste Gruppe (K) erhielt eine Kontrolldiät, die zweite Gruppe (RS) wurde mit einer RS Typ III-angereicherten Diät gefüttert (Tab. 3-4).

Nach einwöchiger Adaptationszeit an das Futter und einer 20-stündigen Fastenperiode wurde die Kolitis durch einmalige rektale Instillation von 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) induziert. Die Induktion erfolgte nach Anästhesie und Fixierung eines Katheders im Kolorektum in 8 cm Entfernung vom Anus durch 15 min Injektion von 20 mg TNBS gelöst in 0.25 ml 50 % Ethanol (v/v) (Morris et al., 1989).

Es wurden jeweils 6 Tiere pro Futtergruppe vor Kolitisinduktion (=Tag 0) und an den Tagen 4, 11 und 21 nach Induktion getötet.

#### 3.8.3.2 Probenentnahme

Die Tötung der Tiere erfolgte mit Kohlendioxid. Für die Erstellung der Differenzialblutbilder wurde Blut abgenommen. Das Zökum und der Dickdarm wurden entnommen und gewogen. Zökum- und Dickdarminhalt sowie Fäzes wurden für die Metabolit-Analyse aufgearbeitet.

Der Dickdarm wurde auf das Ausmaß und die Schwere makroskopischer Läsionen, wie Hyperämie und Ulzeration, untersucht. Aus dem distalen Grenzbereich der Entzündung wurden 2 cm Gewebe für histologische Untersuchungen entnommen, mit eiskaltem PBS gespült und in 4 % PFA fixiert.

Dünndarm und alle weiteren Organe wurden entnommen, gewogen und Proben in 4 % PFA bzw. bei -80 °C asserviert.

#### 3.8.3.3 Erfassung der Schwere des Entzündungsgrades

Zur Erfassung des Schweregrades der Kolitis wurde ein Score entwickelt, der sowohl klinische, makroskopische als auch mikroskopische Parameter einbezog. Der Koltis-Score wird als eigenständiges Ergebnis unter 4.4.1 erläutert.

### 3.9 Histologie und indirekte Immunhistochemie

#### 3.9.1 Gewebeaufarbeitung

Die entnommenen Gewebeproben, sowohl aus der Klinik als auch aus den Tierversuchen, wurden 24 Stunden in 4% PFA/PBS fixiert. Anschließend wurden die Proben 24 Stunden unter fließendem Leitungswasser gespült, im Entwässerungsautomat über aufsteigende Alkoholkonzentrationen dehydriert und über Toluol in Histoplast eingebettet (Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Gewebereinbettung

Medium	Zeit in Stunden	Temperatur in °C	Vakuum
Ethanol, 40 %	2:00	40	
Ethanol, 55 %	2:00	40	ohne
Ethanol, 70 %	1:30	40	ohne
Ethanol, 96 %	1:30	40	ohne
Ethanol, 100 %	0:45	40	ohne
Ethanol, 100 %	1:00	40	ohne
Ethanol, 100 %	1:30	40	ohne
Toluol	2:00	40	ohne
Toluol	2:00	40	mit
Histoplast	1:45	60	mit
Histoplast	1:45	60	mit

Es wurden 2 µm dünne Mikrotom-Schnitte in Serie angefertigt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Für histologische Untersuchungen wurden auszugsweise Schnitte entparaffiniert und Hämalaun&Eosin- bzw. PAS-gefärbt. Die anderen Schnitte dienten immunhistochemischen Untersuchungen. Das Entparaffinieren, Rehydrieren und Dehydrieren der Schnitte erfolgte im Automaten (Tab. 3-6).

Tab. 3-6: Rehydrieren und Dehydrieren von Gewebeschnitten

Rehydrieren der Schnitte		Dehydrieren der Schnitte	
Medium	Zeit (min)	Medium	Zeit (min)
Toluol	2:00	dest. Wasser	0:15
Toluol	3:00	Ethanol, 70 %	1:30
Ethanol, 100 %	2:00	Ethanol, 96 %	2:00
Ethanol, 100 %	3:00	Ethanol, 100 %	2:00
Ethanol, 96 %	2:00	Ethanol, 100 %	2:30
Ethanol, 70 %	1:45	Toluol	2:30
Ethanol, 40 %	2:00	Toluol	3:30
Aqua dest.	1:30	Eindecken in Histomount	

### 3.9.2 H&E-Färbung

Die rehydrierten Schnitte wurden für 1 min in Mayers Hämalaun eingestellt. Anschließend wurde 5 min mit Leitungswasser gebläut, 50 Sekunden mit 1%igem wässriges Eosin gefärbt, 30 s mit Leitungswasser gespült und über Aqua dest. dehydriert und eingedeckt (Tab. 3-6).

### 3.9.3 PAS-Färbung

Die rehydrierten Schnitte wurden 10 min in frisch angesetzter 1%iger wässriger Perjodsäurelösung oxidiert, 3 x in Aqua. dest. gespült, 15 min in Schiffsches Reagens eingestellt und je 3 x 2 min in Sulfidwasser gespült.

Anschließend wurde 15 min in fließendem Leitungswasser gespült und die Kerne mit Hämalaun gegengefärbt. Es wurde wie üblich weiter behandelt: in Aqua dest. gespült, in Leitungswasser gebläut, entwässert und in Histomount eingedeckt (Tab. 3-6).

### 3.9.4 Immunhistochemie - Einfachmarkierung

Die einzelnen Behandlungsschritte, Inkubationszeiten und Arbeitsverdünnungen wurden für die verschiedenen Proteine und das zu untersuchende Gewebe optimiert (Tab. 3-7).

Generell wurden die rehydrierten Serienschnitte wie nachstehend aufgeführt behandelt:

Wenn erforderlich, wurde eine Demaskierung der Antikörperbindungsstellen mittels Mikrowelle durchgeführt. Dazu wurden die rehydrierten Schnitte in Mikrowellenpuffer eingestellt und 5 min äquilibriert. Der restliche Puffer wurde in der Mikrowelle für 2:30 min bei 850 W erhitzt, anschließend wurden die Schnitte in den erhitzten Puffer eingestellt. Die Objektträger wurden 15 min im Wasserbad abgekühlt und 3 min in Aqua dest. gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase - wenn die Detektion über POD/DAB erfolgte - wurde 10 min mit 1 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend in PBS gespült.

Alle weiteren Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden mit einem DAKO-Pen eingegrenzt, um den Lösungsverbrauch zu vermindern. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde für 30 min mit Antikörperverdünnungsmedium bei Raumtemperatur (RT) blockiert und anschließend kurz in PBS gespült.

Danach folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper verdünnt in Antikörperverdünnungsmedium. Anschließend wurden die Objektträger 3 x 4 min mit PBST und 1 x 4 min mit PBS gewaschen.

Die Detektion erfolgte über die Inkubation mit Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper in Antikörperverdünnungsmedium für 30 min bei 37 °C. Nach 4 weiteren Waschschrritten mit PBST/PBS wurde zur Signalverstärkung mit StreptAB-Komplex/POD (verdünnt nach Herstellerangaben) für 30 min bei RT inkubiert. Es schlossen sich 4 Waschschrritte an. Die

POD wurde über Diaminobenzidin (DAB) durch ein braunes unlösliches Reaktionsprodukt visualisiert. Dazu wurden die Schnitte für ca. 20 Sekunden mit DAB inkubiert und anschließend sofort in Aqua. dest. gespült. Die Schnitte wurden dehydriert und eingedeckt (Tab. 3-6).

Zur Kontrolle der Antikörper-Spezifität wurde das Verfahren ohne Primärantikörper im Primärantikörper-Inkubationsschritt durchgeführt (Anhang, Abb. A-1).

Tab. 3-7: Optimierte Immunhistochemie-Protokolle

PAK, Hersteller	Gewebe/ Versuch	MWB (min)	PAKV	PAK IZ, IT	SAK, Biotin-konjugiert, Anti-	SAKV
Calnexin	Human	3:30	1:1000	ü.N., 4 °C	Kaninchen	1:800
COX-1 Santa Cruz	Human	3:30	1:200	ü.N., 4 °C	Ziege	1:1000
	DMH	2:00	1:120			1:400
	TNBS	2:00	1:50			1:400
COX-2 Oxford	Human	2:00	1:400	ü.N., 4 °C	Kaninchen	1:800
	DMH	ohne	1:200			1:400
	TNBS	ohne	1:150			1:400
COX-2 Transduction	Human	2:00	1:300	ü.N., 4 °C	Maus	1:600
	DMH	2:00	1:280			1:600
	TNBS	2:00	1:280			1:600
COX-2 Santa Cruz	Human	2:00	1:350	ü.N., 4 °C	Ziege	1:800
COX-2 Cayman	Human	2:00	1:850	ü.N., 4 °C	Kaninchen	1:800
GI-GPx	Human	3:30	1:1800	ü.N., 4 °C	Kaninchen	1:800
	DMH	3:30	1:2200			1:400
	TNBS	3:30	1:2200			1:400
iNOS Oxford	Human	ohne	1:450	1h, 37 °C	Kaninchen	1:800
	DMH	ohne	1:1700	ü.N., 4 °C		
	TNBS	ohne	1:1800	ü.N., 4 °C		
iNOS Sigma	Human	ohne	1:1300	1h, 37 °C	Kaninchen	1:800
nNOS Sigma	Human	1:30	1:220	ü.N., 4 °C	Maus	1:800
	DMH	ohne	1:90			
	TNBS	ohne	1:90			
15-LOX-1	Human	2:00	1:400	ü.N., 4 °C	Meerschwein	1:800
15-LOX-2 Oxford	Human	ohne	1:1500	ü.N., 4 °C	Kaninchen	1:600
	DMH	2:15	1:1200			
	TNBS	2:00	1:1200			
HSP25 Stressgen	DMH	2:00	1:4500	ü.N., 4 °C	Kaninchen	1:800
	TNBS	2:00	1:3000			
Ki-67 Dako	Human	5:00x2	1:25	1h, 37 °C	Maus	1:800
Ki-67 Dianova	DMH	5:00x2	1:150	1 h, 37 °C	Maus	1:600
	TNBS					
PCNA Dako	Human	4:00	1:140	1 h, 37 °C	Maus	1:800
	DMH	5:00x2	1:550			1:400
	TNBS	5:00x2	1:60			1:400

PAK: Primärantikörper  
 MWB: Mikrowellenbehandlung  
 PAKV: Primärantikörper-Verdünnung  
 IZ: Inkubationszeit

IT: Inkubationstemperatur  
 SAK: Sekundärantikörper  
 SAKV: Sekundärantikörper-Verdünnung  
 ü.N.: über Nacht

### 3.9.5 Immunhistochemie - Doppelmarkierung

Für die Untersuchung der GI-GPx-Lokalisation auf subzellulärer Ebene wurden Doppelmarkierungsexperimente mit Fluoreszenzmarkierung durchgeführt.

Der Ablauf der Immunfärbung erfolgte wie unter 3.9.4. beschrieben. Abweichend von diesem Protokoll wurden jeweils die beiden Primärantikörper sowie die beiden Sekundärantikörper gemeinsam inkubiert. Die Detektion erfolgte für die GI-GPx über einen direkt mit Cy3 konjugierten Sekundärantikörper (rot fluoreszierend). Für das zweite Protein wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper eingesetzt, der wiederum durch 30 min Inkubation bei RT mit Streptavidin Cy2 (grün fluoreszierend) nachgewiesen wurde (Tab. 3-8). Anschließend wurde eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 (blau) durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte für 10 min mit Hoechst 33258 (10 µg/ml in Methanol) bei 37 °C inkubiert und mit Aqua. dest. gespült. Abschließend wurden die Schnitte auf Wasserbasis in Hydromount eingedeckt.

Für die Spezifitätssicherung der Antikörper dienten parallel angefertigte Markierungen der Einzel-Proteine auf seriellen Schnitten sowie zusätzliche Markierungen entsprechend den Doppelmarkierungsprotokollen unter Weglassung jeweils eines Primärantikörpers.

Tab. 3-8: Optimierte Doppelmarkierungs-Protokolle

PAK	MWB min	PAKV	PAK IZ, IT	SA	SAV	Streptavidin Cy2
GI-GPx	s. u.	1:800	ü.N., 4°C	Schaf anti-Kaninchen, Cy3 konjugiert	1:300	
Golgi-58 K Protein	ohne	1:180	ü.N., 4°C	Ziege anti-Maus, biotinyliert	1:800	1:500
β-COP	ohne	1:150	ü.N., 4°C	Ziege anti-Maus, biotinyliert	1:800	1:500
TGN 38	3:30	1:300	ü.N., 4°C	Ziege anti-Maus, biotinyliert	1:800	1:500
Calnexin	3:30	1:1000	ü.N., 4°C	Esel anti-Kaninchen, biotinyliert	1:800	1:500

PAK: Primärantikörper  
 MWB: Mikrowellenbehandlung  
 PAKV: Primärantikörper-Verdünnung  
 IZ: Inkubationszeit

IT: Inkubationstemperatur  
 SA: Sekundärantikörper  
 SAV: Sekundärantikörper-Verdünnung  
 ü.N.: über Nacht

### 3.9.6 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung erfolgte sowohl deskriptiv als auch semi-quantitativ. Für die semiquantitative Auswertung wurde ein Bewertungssystem entwickelt, in welches Häufigkeit und Intensität immunhistochemischer Signale eingehen. Der Score wird als eigenständiges Ergebnis unter 4.1 beschrieben.

### 3.10 Mikroskopie / Mikrophotographie

Die mikroskopischen Untersuchungen und die Fotodokumentation erfolgten mit dem Forschungsmikroskop Eclipse E 1000 (Nikon, Düsseldorf) mit Fluoreszenz-, DIC- und Videoaustattung (CCD-1300 CB, Vosskühler) in Kombination mit dem Echtfarbbildanalysesystem LUCIA G (Nikon, Düsseldorf) und dem Drucker Stylus Photo 750 (Epson, Nagano, Japan).

Für stereomikroskopische Untersuchungen wurden die Mikroskope SZ-STU2 und SZ-PT (Olympus, Japan) in Kombination mit der Kamera SC35 Type12 (Olympus, Japan) eingesetzt.

### 3.11 Statistik

Die Auswertung der Versuche erfolgte unter Verwendung des Statistikprogrammes SPSS. Die Ergebnisse wurden überwiegend graphisch mittels Boxplots dargestellt, weil diese eine Aussage über die zusammenfassende Statistik der Verteilung der Werte erlauben. Der waagerechte Balken innerhalb der Box repräsentiert den Median. Fünfzig Prozent aller Fälle haben Werte innerhalb der Box. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand, der als Differenz zwischen dem 75. und 25 Perzentil berechnet wird. Die schmalen Linien an den Enden der Box stellen den kleinsten und den größten beobachteten Wert dar, der kein Ausreißer ist. Kreise mit einem schwarzen Punkt kennzeichnen Extremwerte und mit ungefüllten Kreisen sind Ausreißer versehen.

Die Signifikanz wurde mit dem U-Test von Mann und Whitney (SPSS) geprüft. Die Signifikanzniveaus sind im Ergebnisteil gesondert ausgewiesen.