

**Vergleich der Genexpression im entzündlichen Kolon-
epithel und im kolorektalen Karzinom im Hinblick auf das
erhöhte Tumorrisiko bei chronisch entzündlichen Darmer-
krankungen**

**DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Karin Eilers
aus
Varazdin, Kroatien**

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland

Korreferent: Prof. Dr. E. Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2007

Abstract

In this thesis, the alterations are investigated that are responsible for an increased tumour risk in colonic epithelium of humans with inflammatory bowel disease (IBD). To detect early signs for a risk of tumour development, suitable markers indicative of tumorigenesis before the appearance of an initial tumour stage should be identified. For this purpose, several relevant genes were investigated at the levels of RNA and protein expression, using the methods of real time PCR and immunofluorescence staining. The samples investigated were obtained from normal colonic epithelium of humans without inflammatory bowel disease (IBD), from colonic epithelium of patients with IBD (patients with ulcerative colitis or Crohn's disease), from intestinal polyps and from intestinal carcinomas of humans without IBD.

The results obtained for RNA expression of COX-2 and IL6 confirm the important function of these genes in inflammation and tumour development also in colonic epithelium. RNA expression of COX-2 and IL6 is significantly increased in the group of patients with ulcerative colitis (UC) and in tumour samples, compared to RNA expression in tissue from normal humans. The amount of IL6 RNA in tissue of the tumour group is several times higher than in the UC group. Also one polyp sample of a patient with UC contained considerably more IL6 RNA than all the other UC samples. This result indicates the suitability of IL6 RNA as a marker of inflammation and UC-associated cancer. Whether the IL6 RNA level will turn out to be useful in practice as an early marker of UC-associated cancer (as a reliable indicator of tumour risk before the appearance of dysplasia or polyp), remains to be demonstrated in further experiments, e.g., by analysing dysplasia samples of UC patients. COX-2 RNA expression is nearly equally high in the UC and the tumour group. Since the amount of COX-2 RNA seems to be similarly increased in inflammatory tissue and in tumours, this gene is not suitable as a marker for UC-associated tumour risk.

β -Catenin RNA expression is found to be significantly increased in the polyp and tumour samples compared with normal tissue. This result confirms the important role of β -catenin in tumour development. In the UC samples, the amount of β -catenin RNA is found to be only slightly increased in comparison with the normal samples.

In the group of intestinal tumour samples, the gene Musashi-1 shows the strongest RNA expression among the four investigated groups. This may be explained by the fact that the Musashi-1 protein is produced in the stem cells of the crypts and that tumour cells returning to an undifferentiated state with the ability of unlimited cell division exhibit a corresponding stem cell - like behaviour. In the UC group, the quantity of Musashi-1 RNA is lowest with a significant difference to the normal group. This can be explained by the importance of repair of damage in inflammatory tissue and the advantage of a reduced proliferation.

The Bcl-2 protein shows no substantial differences between the four investigated groups. Increased values of Bcl-2 RNA expression in the UC group might indicate a tumour risk. However, this assumption has to be confirmed by further experiments, e.g., by the investigation of dysplasia samples, because they represent the transition from inflammation to tumour. A significantly increased amount of p53, at RNA and protein levels, is observed in polyp and tumour samples, but not those of IBD. Only one of the two polyp samples of the UC group showed a nuclear accumulation of p53 protein. All the other IBD samples were negative concerning p53 translocation to the nucleus. This indicates that p53 expression does not rise before the development of dysplasia or a polyp. Therefore, p53 does not seem to be suitable as an early tumour marker, at neither RNA nor protein levels, as far as this should be used as an indicator of IBD-associated tumour risk prior to dysplasia.

The role of survivin as a tumour marker is also confirmed in colonic epithelium, at both RNA and protein levels. Whether the observed increase of survivin RNA expression in some samples of the UC group might be interpreted as an indication of a tumour risk, cannot be definitely answered. Further experiments are required to elucidate whether survivin is suitable as an early marker for the development of IBD-associated tumours.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Ereignisse dem erhöhten Tumorrisiko im Kolonepithel von Menschen mit einer CED zugrunde liegen. Um die Gefahr der Tumorentstehung rechtzeitig erkennen zu können, sollen frühe Marker gefunden werden, die die Bereitschaft, einen Tumor zu entwickeln, noch vor Entstehen seiner Vorstufen anzeigen. Dazu wird mit Hilfe der Methode der Real Time PCR und der Immunfluoreszenzfärbung die RNA- und die Proteinexpression bestimmter Gene untersucht. Das Probenmaterial ist normales Kolonepithel von Menschen ohne CED, Kolonepithel von Patienten mit einer CED, Kolonpolyp- und Kolontumorgewebe von Menschen ohne CED.

Die Ergebnisse der RNA-Expression von COX-2 und IL6 bestätigen deren wichtige Funktion bei Entzündungen und der Entstehung von Tumoren auch im Kolonepithel: Die COX-2- und IL6-RNA-Expression ist in der CU- und in der Tumorgruppe im Vergleich zur Normalgruppe signifikant erhöht.

Der IL6-RNA-Gehalt ist in der Tumorgruppe nochmals um ein Vielfaches höher als in der CU-Gruppe. Auch die Polypprobe eines CU-Patienten hat deutlich mehr IL6-mRNA als die anderen CU-Proben. Daraus lässt sich schließen, dass IL6 auf RNA-Ebene sich als Marker für Entzündungsvorgänge und für CED-bedingte Tumore eignen könnte. Ob sich der IL6-RNA-Gehalt jedoch als früher Marker für die Entstehung CED-bedingter Tumore eignet, wenn er das Tumorrisiko bereits vor Auftreten einer Dysplasie oder eines Polypen anzeigen soll, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beantworten. Mehr Klarheit würde die Untersuchung von Dysplasieproben von CED-Patienten bringen.

Die COX-2-RNA-Expression ist in der CU- und in der Tumorgruppe nahezu gleich. Da der COX-2-RNA-Gehalt bei Entzündungsvorgängen anscheinend genauso stark erhöht ist wie im Tumor, kann er nicht als Marker für ein CED-bedingtes Tumorrisiko funktionieren.

Die β -Catenin-RNA-Expression ist in den Polyp- und in den Tumorproben signifikant erhöht gegenüber den Normalproben, was zeigt, dass β -Catenin bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielt. In den CU-Proben ist der β -Catenin-RNA-Gehalt kaum erhöht gegenüber den Normalproben.

Musashi-1 ist auf RNA-Ebene in den untersuchten Kolontumorproben am stärksten exprimiert, was sich damit begründen lässt, dass Musashi-1 in den Stammzellen der Krypten vorkommt und Tumorzellen die Eigenschaft haben, in einen undifferenzierten, unbegrenzt teilungsfähigen Zustand zurückzukehren und sich somit ähnlich wie Stammzellen zu verhalten. In der CU-Gruppe ist die Musashi-1-RNA-Menge am niedrigsten mit einem signifikanten Unterschied gegenüber der Normalgruppe. Das ist damit erklärbar, dass in entzündlichem Gewebe die Reparatur von Schäden besonders wichtig ist, so dass eine verminderte Zellteilungsrate sinnvoll ist.

Bcl-2 zeigt auf Proteinebene keine auffälligen Unterschiede in den vier Untersuchungsgruppen. Die erhöhten Bcl-2-RNA-Expressionswerte der CU-Gruppe könnten ein Tumorrisiko anzeigen. Diese Annahme muss jedoch durch weitere Experimente abgesichert werden, zum Beispiel durch die Untersuchung von Dysplasieproben, da sie den Übergang von der Entzündung zum Tumor darstellen.

Die signifikant erhöhte p53-Menge auf RNA- und auf Proteinebene betrifft nur die Polyp- und Tumorproben, nicht aber die CED-Proben. Nur eine der beiden Polypproben der CU-Gruppe zeigt eine Anreicherung des p53-Proteins im Zellkern. Alle anderen CED-Proben sind negativ bezüglich einer p53-Anreicherung im Zellkern. Das deutet darauf hin, dass eine erhöhte p53-Expression frühestens in Dysplasien und im Polypgewebe auftritt. Deshalb scheint p53 sich auf RNA- und Proteinebene nicht als früher Tumormarker zu eignen, wenn er ein CED-bedingtes Tumorrisiko noch vor Entstehen der Dysplasie anzeigen soll.

Survivin bestätigt sich auch im Kolonepithel als Tumormarker sowohl auf RNA- wie auch auf Proteinebene. Ob die erhöhte Survivin-RNA-Expression in einigen Proben der CU-Gruppe im Sinne eines damit verbundenen Tumorrisikos interpretiert werden kann, lässt sich nicht mit Sicherheit beantworten. Weitere Experimente wären nötig um zu klären, ob Survivin sich als früher Marker für die Entstehung CED-bedingter Tumore eignet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Sporadisch auftretende, Colitis-assoziierte und erblich bedingte Darmtumore	1
1.2. Modell der schrittweisen Entstehung von Darmtumoren.....	3
1.3. Regulation von Proliferation und Apoptose im Darmepithel.....	4
1.3.1. Der Wnt-Signalweg und seine Zielgene	6
1.4. Entstehung von Darmtumoren bei Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung	7
1.4.1. Molekulargenetische Ursachen bei der CED-bedingten Tumorentstehung.....	8
1.4.2. Übergang von der Entzündung zum Tumor: Die Rolle von COX-2, IL6 und NF- kappaB.....	9
2. Zielsetzung	12
3. Proben, Material und Methoden	14
3.1. Proben	14
3.2. Material	14
3.2.1. Geräte.....	14
3.2.2. Gebrauchsmaterial	15
3.2.3. Chemikalien, Substanzen, Kits	16
3.2.4. Antikörper für die IHC	17
3.2.5. Primer für die Real Time PCR	18
3.3. Methoden	19
3.3.1. Gefrierschneiden am Kryostat	19
3.3.2. Immunfluoreszenzfärbung	19
3.3.3. Peroxidasefärbung.....	20
3.3.4. RNA-Extraktion und photometrische Messung der RNA-Konzentration.....	21
3.3.5. Reverse Transkription.....	22
3.3.6. Real Time PCR.....	22
3.3.6.1. Konstruktion der Primer.....	24
3.3.6.2. Auswertung der Real Time PCR	25
4. Ergebnisse	26
4.1. Immunhistochemische Untersuchung der Genexpression im Kolonepithel: Proteinexpression der Anti-Apoptose-Gene Bcl-2 und Survivin und des Tumorsuppressorgens p53	26
4.1.1. Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2	26
4.1.2. Peroxidasefärbung von Bcl-2.....	45
4.1.3. Immunfluoreszenzfärbung von Survivin.....	47
4.1.4. Immunfluoreszenzfärbung von p53	79
4.2. Untersuchung der Genexpression im Kolonepithel auf RNA-Ebene.....	100
4.2.1. Genexpression von Bcl-2, Survivin und p53 auf RNA-Ebene.....	100
4.2.2. Genexpression von Musashi-1, IL6, COX-2 und β -Catenin auf RNA-Ebene	105
5. Diskussion	110
6. Zusammenfassung.....	117
Abkürzungen	119
Danksagung	121
Literaturverzeichnis	122
Lebenslauf.....	131

1. Einleitung

Das Kolonkarzinom beim Menschen ist der zweithäufigste Tumor in den Industrieländern und gehört zu den am besten erforschten Tumoren. Bei seiner Entstehung spielen viele Faktoren eine Rolle, dazu gehören Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel Ernährungsverhalten und körperliche Bewegung, aber auch genetische Ursachen.¹ Bei Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED), wie Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn, ist das Risiko, einen Darmtumor zu bekommen, um ein Vielfaches erhöht.

Es gibt gegenwärtig mehrere anerkannte Theorien über die molekularbiologischen Entstehungsmechanismen von Darmtumoren.² Diese beinhalten verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen der Zellen. Bei der Einteilung in verschiedene Modelle der Tumorentstehung ist zu berücksichtigen, dass die Entwicklung eines Darmtumors nicht unbedingt einem der beschriebenen Modelle folgen muss. Umgekehrt kann ein Modell nicht die Entstehung aller Tumore beschreiben.³

1.1. Sporadisch auftretende, Colitis-assoziierte und erblich bedingte Darmtumore

Darmtumore treten in der überwiegenden Zahl der Fälle sporadisch auf, das heißt es liegt keine erbliche Krankheitsform vor und auch keine Vorbelastung durch eine CED.

Zu einem geringen Prozentsatz, etwa 5-10%, sind Darmtumore erblich bedingt. Die Veranlagung zur Tumorentstehung wird über die Keimbahn an die Nachkommen vererbt. Dass es sich um einen erblich bedingten Darmtumor handelt ist daran erkennbar, dass er familiär gehäuft auftritt, falls es sich in wenigen Ausnahmefällen nicht um eine Neumutation handelt. Zu den erblichen Formen des Kolonkarzinoms gehören die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC).^{4,5}

Die FAP ist in 95% der Fälle mit chromosomaler Instabilität verbunden, das heißt mit Verlust oder Gewinn ganzer Chromosomen oder Teile von Chromosomen. Ursache der FAP sind Keimbahnmutationen im APC (Adenomatöse Polyposis Coli)-Gen. Die Erkrankung wird autosomal dominant vererbt, das heißt jeder Genträger entwickelt eine FAP. Als Konsequenz bilden sich Hunderte bis Tausende zunächst gutartige Darmpolypen, von denen einige zu Tumoren entarten.⁶

Mutationen im APC-Gen gelten als ein frühes Ereignis auf dem Weg zur Tumorentstehung und spielen nicht nur bei der FAP, sondern auch bei den meisten sporadischen Kolonkarzinomen eine Rolle. Als Ergebnis werden Gene aktiviert, die für verstärkte Proliferation sorgen, wodurch Adenome entstehen können, aus denen sich Tumore entwickeln.

Die HNPCC entsteht durch ein fehlerhaftes DNA-Reparatursystem, was zur Mikrosatelliteninstabilität führt. Dabei handelt es sich um Längenunterschiede von Mikrosatelliten, repetitive Einheiten des Genoms, die aus einer Abfolge gleicher Basensequenzen bestehen. Auch hier bilden sich als Konsequenz Polypen, die zu Tumoren werden können. Ursache für das defekte DNA-Reparatursystem ist im Fall des HNPCC entweder eine Mutation oder die Hypermethylierung, eine epigenetische Veränderung. Zum Beispiel wird durch Hypermethylierung der Promotorregion des DNA-Reparaturgens MLH1 (mutL homolog 1) das Gen inaktiviert und nicht mehr transkribiert.^{7,8}

Das Phänomen der Hypermethylierung von DNA-Abschnitten, die normalerweise nicht methyliert sind, tritt auch unabhängig von der Krankheitsform des HNPCC bei den sporadischen Tumoren auf. Neben dem MLH1-Gen können noch viele andere Gene methyliert sein, zum Beispiel Gene, die zuständig sind für die Regulation von Zellzyklus und Apoptose oder Tumorsuppressorgene. Die Inaktivierung dieser Gene kann dann zur Tumorentstehung führen.^{9,10}

Bei der Entstehung der sporadisch auftretenden Kolonkarzinome spielen somatische Mutationen als Ursache eine zentrale Rolle. Die Mutationen können zur Aktivierung von Onkogenen (zum Beispiel k-ras) oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (zum Beispiel APC, p53, DCC=deleted in colorectal cancer) führen. Aufgrund einer Anhäufung dieser Mutationen kommt es zur Bildung eines Tumors (Multistep-Karzinogenese).¹

Durch Mikrosatelliteninstabilität herbeigeführte Darmtumore befinden sich überwiegend im rechten Darmabschnitt, im Colon ascendens. Die sporadisch auftretenden Kolonkarzinome und die FAP-Tumore sind dagegen vor allem im linken Darmabschnitt, Colon descendens, lokalisiert.³

Eine chronische Entzündung beinhaltet ein deutlich erhöhtes Risiko der Tumorentstehung. Viele Tumore, wie auch die Colitis-assoziierten (CED-bedingten) Tumore, lassen sich auf chronische Entzündungen zurückführen und treten am Ort der Entzündung auf.

Wie bei den erblichen Formen entsteht das sporadisch auftretende und auch das CED-bedingte Kolonkarzinom über das Adenom als Tumor-Vorstufe. Die Entwicklung des Kolonkarzinoms über das Adenom ist verbunden mit morphologischen Veränderungen im Darmepithel: Die Anzahl an Becherzellen im Epithel nimmt ab und somit auch die Schleimsekretion; es treten mehrreihige Zelllagen des Darmepithels auf im Gegensatz zum einreihigen Epithel im Normalgewebe und die Kern-Cytoplasma-Relation nimmt ab. Im Kolonkarzinom gibt es keine Schleimproduktion mehr und die Zellkerne liegen zentral in der Zelle statt basal, wie es im Normalgewebe der Fall ist (Abb. 1-1 und Abb. 1-2).

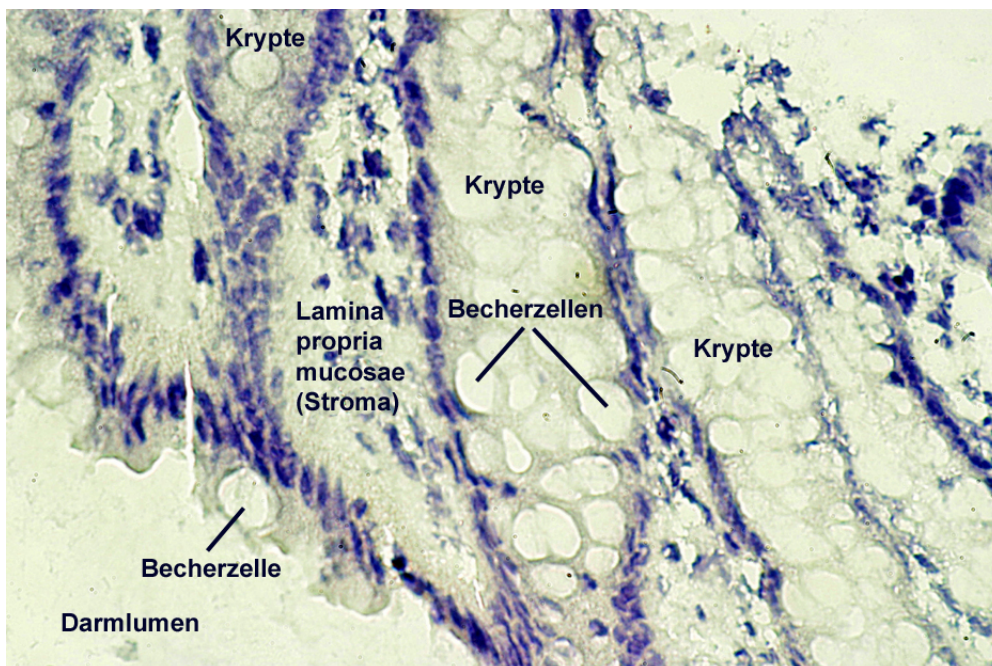


Abb. 1-1: Ausschnitt aus dem Kolonepithel, Normalgewebe. Hämalaungefärbter Gefrierschnitt. Originalvergrößerung 400 x. Eigenes Präparat.

Das Epithel besitzt viele Becherzellen, die der Schleimsekretion dienen. Der Schleim schützt vor schädlichen chemischen, physikalischen und mikrobiellen Einflüssen. Die Zellkerne liegen basal in der Zelle und das Epithel ist einreihig.

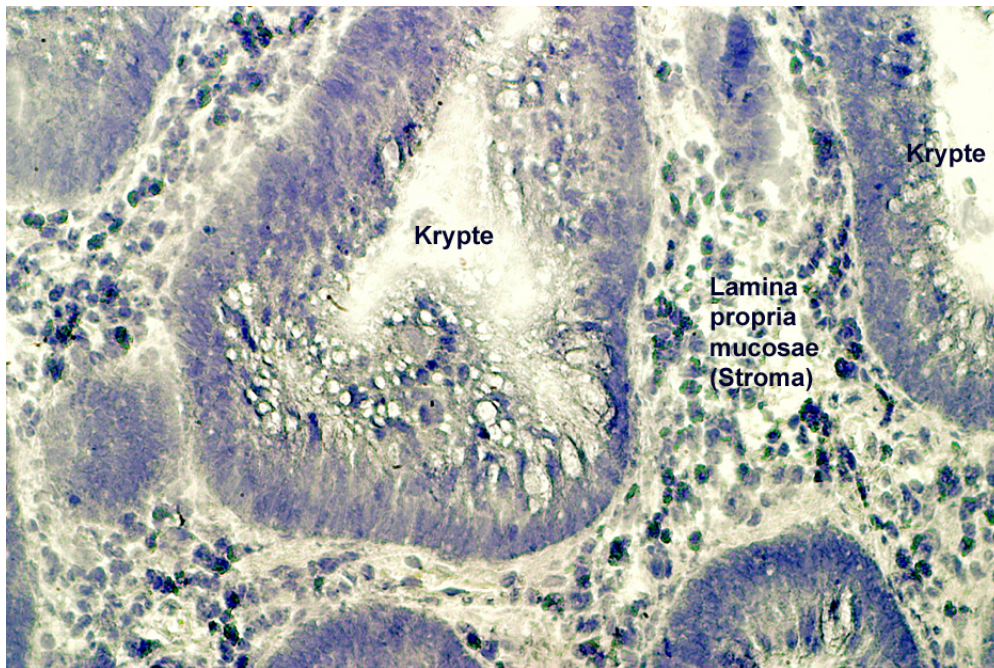


Abb. 1-2: Ausschnitt aus dem Kolonepithel, Adenom. Hämalaungefärbter Gefrierschnitt. Originalvergrößerung 100 x. Eigenes Präparat.
Das Epithel der Krypten ist mehrreihig; die Zellkerne liegen zentral in den Zellen und es sind weniger Becherzellen vorhanden, was verbunden ist mit geringerer Schleimsekretion.

1.2. Modell der schrittweisen Entstehung von Darmtumoren

Die Vorstellung der schrittweisen Entstehung des Kolonkarzinoms über mehrere Vorstufen vom normalen Epithel über frühe und späte Stadien des Adenoms bis zum Karzinom wurde erstmals in den späten achtziger Jahren von Fearon und Vogelstein entwickelt. In diesem Modell kommt es durch Mutation im APC-Gen zu dysplastischen Veränderungen im Darmepithel, die die Vorläufer des Adenoms darstellen. Durch das Hinzukommen weiterer Mutationen, zum Beispiel in p53 und in k-ras, entwickelt sich schließlich aus dem Adenom ein Karzinom.^{11,12}

Darüber, ob die Mutationen in den Stammzellen der Krypten oder in den differenzierten Kolonepithelzellen stattfinden müssen, um zum Tumor zu führen, herrscht Uneinigkeit. Seit langem wird angenommen, dass es die Stammzellen sind, in denen sich die Mutation ereignen muss, weil dann eine Akkumulation von Mutationen am wahrscheinlichsten ist. Die Mutation wird bei jeder Zellteilung weitergegeben, neue Mutationen können hinzukommen.¹³ Andererseits weiß man, dass eine Akkumulation von Mutationen auch in Tumorzellen möglich ist.² Es gibt Berichte, dass APC-Mutationen in den differenzierten Zellen im oberen Teil der Krypte gefunden wurden, im unteren Teil derselben Krypte aber nicht, was für den oberen, differenzierten Teil der Krypte als Ausgangspunkt der Tumorentstehung spräche.¹⁴

Das Modell von Fearon und Vogelstein ist eine sehr vereinfachte Beschreibung der Entstehung von Darmtumoren. Es sind noch weitere Gene entscheidend beteiligt. Dabei handelt es sich vor allem um Gene, die bei der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose eine wichtige Rolle spielen.

1.3. Regulation von Proliferation und Apoptose im Darmepithel

Das Darmepithel ist das am schnellsten sich erneuernde Gewebe des Menschen. Es schützt den Organismus vor dem Eindringen von Giftstoffen, schädlichen Nahrungsbestandteilen und pathogenen Mikroorganismen. Die Lebensdauer einer Darmepithelzelle beträgt maximal sieben Tage. Um das Gleichgewicht zwischen dem programmierten Zelltod „alter Zellen“ und der Bildung neuer Zellen, die die alten ersetzen, aufrechtzuerhalten, ist eine strenge Regulation von Zellteilung, Differenzierung und Apoptose wichtig. Eine Störung dieser Regulation kann viele Ursachen haben.

In den Krypten des Darmepithels haben die von den Stammzellen gebildeten Progenitorzellen die Funktion, durch Zellteilung für die ständige Erneuerung des Epithels zu sorgen.^{15,16} Dieser Prozess läuft unten in der Basis der Krypten ab. Die neu gebildeten Zellen wandern innerhalb von drei bis fünf Tagen Richtung Darmlumen in den oberen Bereich der Krypten und werden dann abgestoßen.^{17,18} Abb. 1-3 zeigt einen Ausschnitt aus dem Kolonepithel.

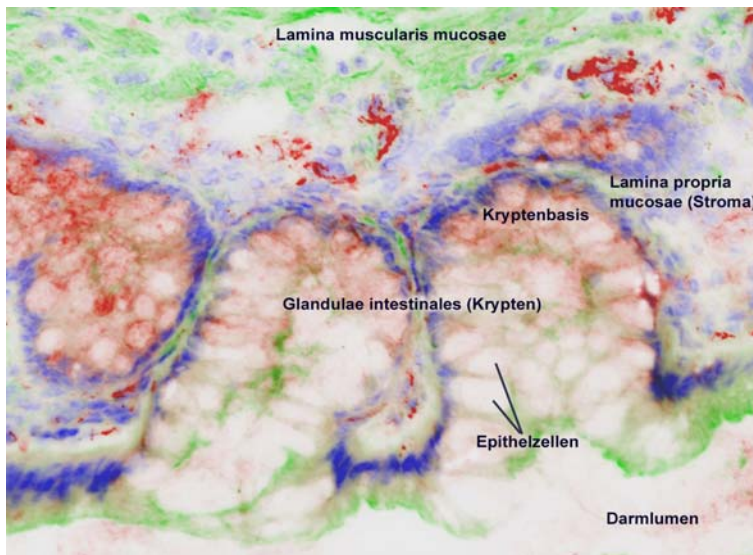


Abb. 1-3: Ausschnitt aus dem Kolonepithel, Normalgewebe. Immunfluoreszenzfärbung eines Gefrierschnitts. Eigenes Präparat. Doppelfärbung von Bcl-2 (rot) und Actin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Kryptenbasis und Lymphozyten zeigen Bcl-2-Färbung, Zellmembranen und Lamina muscularis mucosae zeigen Actinfärbung.

Das Anti-Apoptose-Gen Survivin ist überwiegend in der Basis der Krypten vorhanden. In den meisten adulten Geweben fehlt es. Survivin wird während der Embryonalentwicklung exprimiert und außerdem in vielen Tumoren, auch im kolorektalen Karzinom. Es hemmt die Apoptose und fördert die Proliferation. Es assoziiert während der Mitose an die Mikrotubuli des Spindelapparates. Eine Störung dieser Interaktion führt zum Verlust der Antiapoptose-Funktion des Survivins und zu einer erhöhten Caspase-3-Aktivität. Survivin wird mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht^{19,20} und gilt als Proliferations- und Tumormarker.

Bcl-2, auch vorwiegend in der Basis der Krypten exprimiert, begünstigt bei Überexpression ebenfalls die Entstehung von Tumoren über eine reduzierte Apoptose.²¹

Musashi-1 ist ein weiteres Gen, das in der Basis der Krypten des Kolonepithels exprimiert wird und gilt als Marker für Stammzellen. Es spielt vermutlich eine Rolle bei der Zellteilung der Stammzellen oder der aus ihnen hervorgehenden Progenitorzellen, aus denen die differenzierten Epithelzellen entstehen.^{22,23}

Bei der Regulation der Proliferationsrate sind weitere Gene entscheidend beteiligt, zum Beispiel die Gene APC und β -Catenin. APC ist Teil eines Proteinkomplexes, des GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β)/ APC/ Axin - Komplexes, das die Konzentration von freiem, nicht

membrangebundenem β -Catenin in der Zelle reguliert. Die Konzentration von freiem β -Catenin hat wiederum Einfluss auf die Proliferationsrate der Zelle.²⁴ Die Ansammlung von freiem, nicht membrangebundenem β -Catenin in der Zelle wird als ein frühes und möglicherweise initiiertes Ereignis bei der Entstehung von Darmtumoren diskutiert.²⁵

Im oberen Bereich der Krypten teilen sich die differenzierten Epithelzellen nicht mehr und am Ende ihrer Lebensdauer tritt die Apoptose ein.

Eine gestörte Regulation des Zellzyklus hat einen zentralen Stellenwert bei der Karzinogenese, wobei der Übergang von der G1- in die S-Phase kritisch ist.²⁶ Der Zellzyklus wird entscheidend von p53, ein Tumorsuppressorgen, gesteuert.²⁷ Bei Zellen mit DNA-Schäden verhindert p53 den Eintritt in die S-Phase. Punktmutationen im p53-Gen sind eine häufige Ursache für Tumoren. Sie erzeugen ein abnormes p53-Protein, das stabiler ist als das Wildtyp-Protein. Es sammelt sich im Zellkern der betroffenen Zelle an und bildet Proteinkomplexe mit dem intakten p53, wodurch die Funktion von diesem außer Kraft gesetzt wird. Die Folge ist eine ungenügende Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose, so dass auch Zellen mit DNA-Schäden die Zellteilung durchlaufen. Es herrscht weitgehende Einigkeit darüber, dass verhinderte Apoptose der Hauptgrund für die Entwicklung eines Tumors ist.²⁸

Einen zentralen Stellenwert bei der Regulation der Apoptose haben auch die Caspasen, die wiederum von einer anderen Familie von Proteinen reguliert werden, der Bcl-2-Familie. Die Apoptose wird eingeleitet durch die Aktivierung einer Kaskade von Caspasen, proteolytische Enzyme, die zunächst in inaktiver Form vorliegen. Den Anfang dieser Signalkette bilden die initiierten Caspasen, Caspase-2, -8, -9 und -10, die das Apoptose-Signal weitergeben an die ausführenden Caspasen, von denen Caspase-3 die wichtigste ist. Caspase-3 wird durch proteolytische Spaltung aktiviert und ist in der aktiven Form ein Heterotetramer, bestehend aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten. Ihre Aufgabe ist, die Spaltung bestimmter Moleküle einzuleiten, darunter das DNA-Reparaturenzym poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) und den DNA-Fragmentierungsfaktor (DFF), was zu den für die Apoptose typischen 180 bp DNA-Strang-Brüchen führt.^{29,30,31} Die ersten Signale, die die Apoptose einleiten und die am Anfang der Kaskade stehenden Caspasen aktivieren, sind unter anderem Cytochrom c, das von den Mitochondrien freigesetzt wird, und die Bindung von FasL an den Fas-Rezeptor.³² Eine Schädigung der Mitochondrienmembranen löst damit unweigerlich die Apoptose aus.³³ Die Freisetzung von Cytochrom c führt zur Bildung des sogenannten „Apoptosoms“, ein Multiproteinkomplex aus initiierten Procaspasen und einem „Gerüstprotein“, das es den Procaspasen ermöglicht, sich durch proteolytische Spaltung selbst zu aktivieren. Die Bildung des Apoptosoms wird durch die Familie der Bcl-2-Proteine reguliert.

Bcl-2 verhindert die Bildung des Apoptosoms und blockiert so die Apoptose. Die ebenfalls zur Bcl-2-Familie gehörenden proapoptotischen Proteine Bak und Bax sind Antagonisten der antiapoptotischen Bcl-2-Untergruppe und haben den gegenteiligen Effekt; sie fördern die Apoptose. Die Aktivität dieser zwei gegenteilig wirkenden Untergruppen der Bcl-2-Familie beeinflusst die Entscheidung, ob die Apoptose eingeleitet wird oder nicht.³⁴ Einige der antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder werden kontrolliert durch den Transkriptionsfaktor NF-kappaB. Die proapoptotischen Mitglieder, wie Bak und Bax, tragen zur Bildung von Poren in den Mitochondrienmembranen bei, was die Freilassung von proapoptotischen Proteinen, wie zum Beispiel Cytochrom c ins Cytoplasma erleichtert.³⁵

Ein weiteres Molekül, das Einfluss auf die Apoptose hat, ist Buttersäure. Sie wird im Darm durch Vergärung von Kohlenhydraten gebildet und hat vielfältige biologische Effekte. Sie spielt eine wichtige Rolle beim Schutz vor Darmtumoren. Sie hemmt das Wachstum von Tumorzellen und fördert die Apoptose. Versuche mit Zellkulturen deuten darauf hin, dass die Apoptose-fördernde Wirkung von Buttersäure über den Caspase-Signalweg verläuft, wobei die Aktivierung von Caspase-3 ein notwendiges Ereignis darstellt. Auch der Bcl-Signalweg scheint beteiligt zu sein durch Hochregulierung des proapoptotischen Proteins Bak.^{30,34}

1.3.1. Der Wnt-Signalweg und seine Zielgene

Der Wnt-Signalweg nimmt bei entwicklungsregulatorischen Prozessen eine wichtige Stellung ein und ist während der Evolution hoch konserviert geblieben.³⁶ Auch in adulten, sich ständig erneuernden Geweben hat er eine entscheidende Bedeutung. Ein häufiger Grund für die Entstehung von Tumoren in sich erneuernden Geweben ist eine gestörte Regulation des Wnt-Signalwegs, die in einer übermäßigen Zellteilung resultiert. Das Darmepithel ist das am besten verstandene Beispiel für den Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und gestörter Wnt-Regulation in sich erneuernden Zellen.³⁷

Mutationen im APC-Gen sind eine häufige Ursache von Darmtumoren. APC wird in diesem Zusammenhang eine „gatekeeper-Funktion“ zugesprochen.⁵ APC-Mutationen können zum Verlust der Proteinfunktion führen, was über den Wegfall der GSK-3 β / APC/ Axin - vermittelten Degradation von β -Catenin eine Anhäufung von freiem β -Catenin in der Zelle bewirkt, was wiederum in einer gesteigerten Proliferation der Zelle resultiert. Der GSK-3 β / APC/ Axin - Komplex ist Teil des Wnt-Signalwegs.

Die Wnt (wingless-type)-Gene codieren eine große Familie von sekretorischen Proteinen, die wichtig sind bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen in embryonalem Gewebe und im Magen-Darm-Trakt.

Das Wnt-Protein bindet an einen spezifischen Transmembranrezeptor, den Fz (frizzled)-Rezeptor. Das Zusammenwirken von Wnt und dem Fz-Rezeptor wird durch eine andere Gruppe von Proteinen reguliert, die Wnt-Antagonisten. Durch Bindung von Wnt an den Fz-Rezeptor kommt es zur Inaktivierung des GSK-3 β / APC/ Axin - Komplexes in der Zelle, so dass dieses freie β -Catenin nicht mehr abbaut, welches sich deshalb im Cytoplasma anhäuft, in den Nucleus wandert und dort als Teil des TCF (T-Cell Factor)/ LEF (Lymphoid Enhancer Factor) - Transkriptionsfaktorkomplexes die Transkription bestimmter Zielgene auslöst, was schließlich zu einer gesteigerten Proliferation der Zelle führt.²⁶

Zu diesen Zielgenen gehören zum Beispiel cyclin D1, ein Regulator des Zellzyklus,^{38,39} und das Oncogen c-myc.^{40,41}

Auch Survivin scheint eines der Zielgene zu sein, das durch den TCF/ β -Catenin - Komplex aktiviert wird, was bewirkt, dass die Kolonepithelzellen sich wieder ähnlich wie Stammzellen verhalten, verbunden mit gesteigerter Proliferation und verminderter Apoptose.¹⁹

Ein weiteres Zielgen des Wnt/ β -Catenin - Signalwegs ist Cdx1 (Caudal type homeo box transcription factor 1), ein Homöobox-Gen, das während der Embryonalentwicklung die Morphogenese und Differenzierung der Organe steuert und im adulten Organismus in den proliferierenden Zellen in der Basis der Darmkrypten exprimiert wird.³⁶ Es ist nachgewiesen worden, dass der Cdx1-Promotor eine Bindestelle für den β -Catenin/ TCF - Komplex besitzt.³⁶ Cdx1 wird eine oncogene Wirkung zugeschrieben. Bei in vitro- Untersuchungen ist festgestellt worden, dass eine Überexpression von Cdx1 zu erhöhter Proliferation führt und die Apoptose hemmt.⁴² Die Cdx1-Expression ist in den meisten Darmpolyphen erhöht. Cdx1 scheint vor allem bei den ersten Schritten auf dem Weg zur Tumorentstehung eine wichtige Rolle zu spielen.⁴³ Es gibt dazu widersprüchliche Daten, denn es wird andererseits auch von reduzierter Cdx1-Expression im Adenom und Karzinom berichtet.^{44,45}

Im Gegensatz zu Cdx1 wird Cdx2 die Funktion eines Tumorsuppressors zugesprochen. Cdx2 wird vor allem in den differenzierten Zellen im oberen Teil der Darmkrypten exprimiert. Es gibt Berichte, dass Cdx2 während der Karzinogenese herunterreguliert ist und dass eine Überexpression von Cdx2 die Proliferation hemmt und die Differenzierung von Darmepithelzellen und Darmtumorzellen fördert.⁴⁶ Es gibt Daten über eine verminderte Cdx2-Expression bei Tumoren späten Stadiums.⁴⁷

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Rolle von Cdx1 und Cdx2 bei der kolorektalen Karzinogenese besser zu verstehen.

1.4. Entstehung von Darmtumoren bei Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) und die Entstehung von Darmtumoren stehen in einem engen Zusammenhang.⁴⁸ Menschen mit einer CED, dazu gehören die Colitis Ulcerosa (CU) und der Morbus Crohn (MC), haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein bis zu 20-fach höheres Risiko, einen Darmtumor zu bekommen. Das gilt vor allem bei Bestehen einer langjährigen Colitis Ulcerosa, weniger bei einer Crohn Colitis. Das Karzinomrisiko ist abhängig von der Dauer der CED und vom Erkrankungsmaß.^{49,50,51} Während bei den sporadisch auftretenden Kolonkarzinomen etwa 50% der Patienten älter als 65 Jahre sind, bekommen Patienten mit einer CED statistisch gesehen 10 bis 20 Jahre früher einen Darmtumor.¹

Dass chronische Entzündung und Karzinogenese eng miteinander verknüpft sind,^{52,53} sieht man auch daran, dass entzündungshemmende Medikamente nicht nur die Entzündung bekämpfen, sondern auch der Entwicklung eines Tumors entgegenwirken.⁵⁴

Bei Colitis Ulcerosa- und Morbus Crohn- Patienten gibt es bezüglich der Entstehung kolorektaler Karzinome mehrere Gemeinsamkeiten: Kolorektale Karzinome treten sowohl bei CU- wie auch bei MC- Patienten meistens nach mehr als achtjährigem Bestehen der CED auf. Das Karzinom entsteht fast immer in makroskopisch sichtbar erkrankten Bereichen des Darmepithels. In etwa drei Viertel der Fälle sind sowohl bei CU- wie auch bei MC-Patienten Dysplasien vorhanden. Das deutet auf einen gleichen zugrunde liegenden Mechanismus der Entstehung kolorektaler Karzinome bei CU- und MC- Patienten hin.⁵⁵

Die molekulargenetischen Vorgänge bei der CED-bedingten Tumorentstehung sind weniger gut erforscht als bei den sporadisch auftretenden Kolonkarzinomen.⁵⁶ Man geht davon aus, dass auch die CED-bedingten Tumore über mehrere Stufen schrittweise entstehen,⁵⁷ wobei eine Kolitis-Dysplasie-Karzinom-Sequenz bei der CED-bedingten Tumorentstehung der Adenom-Karzinom-Sequenz bei den sporadischen Kolonkarzinomen entspricht.⁵⁸ Die dysplastischen Epithelveränderungen bei Colitis Ulcerosa- Patienten, die die Tumorstufen darstellen, sind flach und bei der Endoskopie relativ schwierig zu identifizieren, so dass viele Stufenbiopsien auf Verdacht entnommen werden müssen. Durch Anfärben des Darmepithels mit einer 0,1-prozentigen Methylenblau-Lösung während der Endoskopie können deutlich mehr dysplastische Veränderungen und intraepitheliale Neoplasien identifiziert werden.⁵⁹

Die Ursachen für die Entstehung einer CED sind noch nicht aufgeklärt. Als gesichert gilt, dass eine unkontrollierte, übermäßig aktive Immunantwort des Darms auf das normale Darmmilieu dabei eine wichtige Rolle spielt.⁶⁰ Da die CED familiär gehäuft auftritt und eineiige Zwillinge oft beide betroffen sind (über 55%) im Gegensatz zu zweieiigen Zwillingen (unter 5%), muss davon ausgegangen werden, dass genetische Ursachen bei der Entstehung einer CED große Bedeutung haben.⁶¹ Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von LRH-1, ein Protein, das bei der Glucocorticoidsynthese beteiligt ist, einen schützenden Effekt hat bezüglich des Auftretens chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Bei Patienten mit einer CED besteht ein inverser Zusammenhang zwischen der LRH-1-Genexpression und der Entzündung. Anscheinend reguliert LRH-1 die Immunantwort des Darms über die Glucocorticoidproduktion im Darmepithel und wirkt chronischen Entzündungen des Darms entgegen.^{62,63}

Bezüglich Morbus Crohn scheint eine Mutation des NOD2 (CARD15)-Gens bei etwa 25% der Morbus Crohn-Patienten für die Krankheit verantwortlich zu sein.⁶⁴ NOD2 ist bei der Bakterienabwehr entscheidend beteiligt und sorgt für eine Aktivierung von NF-kappaB. Mit dem NOD2-System arbeiten die Toll-like-Rezeptoren eng zusammen. Sie erkennen bestimmte Bakterienoberflächenstrukturen und leiten das Signal ins Zellinnere weiter, woraufhin eine Kaskade entzündungsspezifischer Reaktionen in Gang gesetzt wird. Was die Colitis Ulcerosa betrifft, sind bisher noch keine Gendefekte identifiziert worden, die ursächlich unmittelbar für die Entstehung der Krankheit verantwortlich sind.

1.4.1. Molekulargenetische Ursachen bei der CED-bedingten Tumorentstehung

Bei den sporadischen und bei den CED-bedingten Kolonkarzinomen führen Störungen in der Regulation des Zellzyklus zur Tumorentstehung.⁶⁵ Auch bei der CED-bedingten Karzinogenese kann der Wnt-Signalweg beteiligt sein.⁶⁶ Das kann mit einer Abnahme von membranengebundenem und einer Zunahme von cytoplasmatischem, freiem β -Catenin verbunden sein.^{67,68}

Die chronische Entzündung führt oft zur immer wiederkehrenden Zerstörung des betroffenen Gewebes. Um die zerstörten Zellen zu ersetzen, steigt die Proliferationsrate an.⁶⁹ Die beschleunigte Zellerneuerung erhöht die Gefahr der Entstehung von Zellen, die ein krebserregendes Potential in sich tragen.⁷⁰ Dabei handelt es sich um genetische Veränderungen, die auch bei den sporadischen Kolonkarzinomen vorkommen, nämlich Deletionen, Mikrosatelliteninstabilität und Mutationen. Diese genetischen Veränderungen sind bei Menschen mit einer CED in Darmtumoren und auch in Dysplasien des Darmepithels zu finden.⁷¹

Aufgrund der Schädigung des Darmepithels durch die CED sind andere Wege der Tumorentstehung im Vergleich zu den sporadisch auftretenden Tumoren denkbar. Tatsächlich gibt es Unterschiede bei den molekulargenetischen Ursachen der CED-bedingten und der sporadischen Kolonkarzinome. Die Unterschiede betreffen die Häufigkeit und das zeitliche Auftreten bestimmter genetischer Veränderungen. Mutationen in k-ras, APC und p53 werden bei den sporadischen und auch bei den CED-bedingten Kolonkarzinomen gefunden. Mutationen im ras-Gen und im APC-Gen sind jedoch bei den Colitis Ulcerosa (CU) -bedingten Darmtumoren um ein mehrfaches seltener als bei den sporadischen Darmtumoren.^{72,73,74}

Mutationen im p53-Gen sind bei den sporadischen Kolonkarzinomen ein spät auftretendes Ereignis.⁷⁵ Bei Vorliegen einer Colitis Ulcerosa treten p53-Mutationen bereits in den Dysplasien, den Vorstufen der Darmtumore auf^{76,77} und scheinen die Entwicklung der Dysplasie zu fördern.⁷⁸ p53-Mutationen finden sich außerdem in Bereichen des Darmepithels, die keine Dysplasie aufweisen.⁷⁹ Das häufige Vorkommen von p53-Mutationen in nicht kanzerösem Darmepithel bei Menschen mit Colitis Ulcerosa ist als eine Folge der Entzündung des betroffenen Gewebes beschrieben worden: Die am Ort der Entzündung in erhöhter Konzentration gebildeten Sauerstoffradikale haben in dem durch die Entzündung veränderten Milieu ein größeres Potential, genetische Schäden zu verursachen.⁸⁰ Dabei scheint die Konzentration an Stickstoffmonoxid (NO) und die Aktivität der Stickstoffoxydsynthase-2 (NOS2) eine wichtige Rolle zu spielen.⁸¹ Außerdem gibt es Hinweise, dass NO durch funktionelle Interaktion, eventuell über NOS2 und deren Produkte, mit dem mutierten p53 eine tumorfördernde Wirkung hat.⁸²

Ein weiteres frühes Ereignis, das noch vor dem Entstehen von Dysplasien auftreten kann und bei CU-Patienten auf eine Tumorgefahr hinweist, sind Aneuploidien.^{83,84} Es gibt deutliche Hinweise dafür, dass Aneuploidien Dysplasien verursachen (Aneuploidie-Dysplasie-Sequenz). Bei sporadischen Kolonkarzinomen sind Aneuploidien dagegen späte Ereignisse.⁷⁷ Aneuploidien zeigen mit dem Auftreten von p53-Mutationen keine Korrelation, so dass man davon ausgehen kann, dass p53-Mutationen allein wahrscheinlich nicht für das Entstehen von Aneuploidien verantwortlich sind.⁷⁷

Eine enge Korrelation besteht zwischen dem Vorhandensein von p53-Mutationen und dem Grad der Dysplasie. Das frühe Auftreten von p53-Mutationen und die hohe Korrelation mit dem Dysplasiegrad bei der CU-bedingten Tumorentstehung bietet die Möglichkeit, nicht eindeutig zuzuordnende Dysplasien besser klassifizieren zu können und Patienten mit erhöhtem Tumorrisiko eher erkennen zu können.⁷⁷

Widersprüchliche Daten gibt es bezüglich der Expression von Bcl-2 in CU-bedingten und sporadischen Darmtumoren. Es wird von einer niedrigeren Bcl-2-Expression in CU-bedingten im Vergleich zu sporadischen Darmtumoren berichtet.⁸⁵ Andere Arbeitsgruppen fanden keinen Unterschied in der Bcl-2-Expression, berichten aber von einer höheren Survivin-Expression und damit verbundenen niedrigeren Apoptose in CU-bedingten Kolonkarzinomen im Vergleich zu den sporadisch entstandenen.⁸⁶

1.4.2. Übergang von der Entzündung zum Tumor: Die Rolle von COX-2, IL6 und NF-kappaB

Dass chronisch entzündliche Erkrankungen die Tumorentstehung fördern, gilt nicht nur für den Darm, sondern auch für viele andere Organe. Viele Tumore entstehen an Orten chronischer Entzündungen.^{87,88,89}

Die in den Ort der Entzündung einwandernden Entzündungszellen, wie zum Beispiel Makrophagen und Lymphozyten, haben in chronisch entzündlichen Bereichen und in Tumoren einen erhöhten Sauerstoffbedarf und geben deshalb vermehrt Stickstoffmonoxid (NO) und andere Sauerstoffradikale ab. Diese können DNA-Schäden verursachen und wirken bei erhöhten Konzentrationen karzinogen.^{90,91} NO hemmt außerdem die DNA-Reparatur-Mechanismen.⁹²

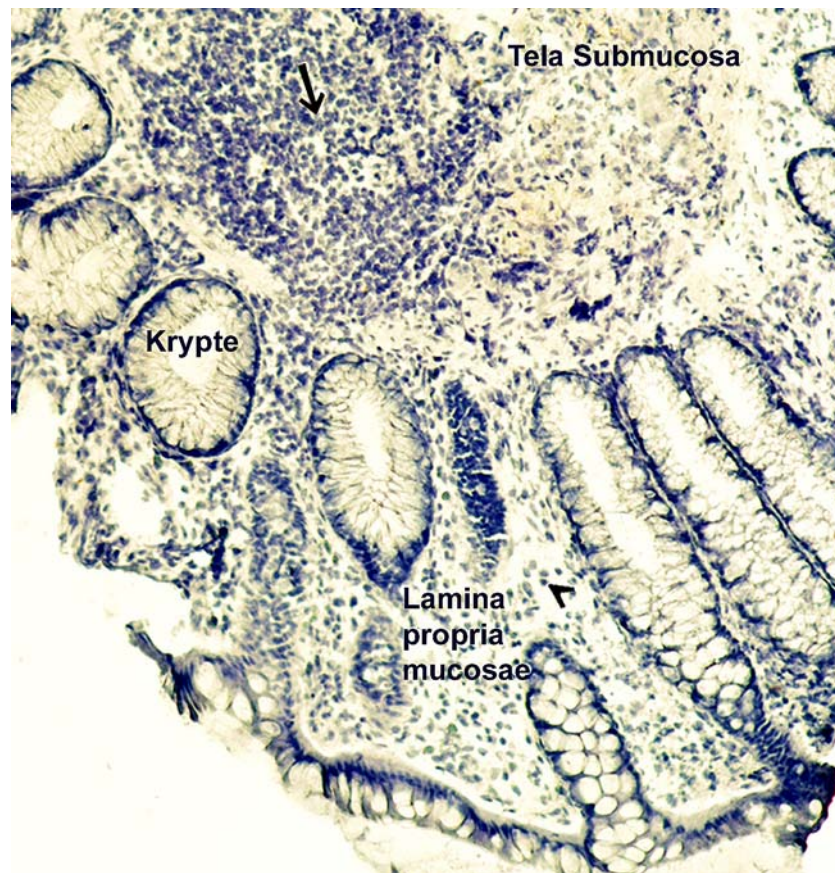


Abb. 1-4: Ausschnitt aus dem Kolonepithel, Pseudopolypgewebe eines Patienten mit Colitis Ulcerosa. Hämalaun-gefärbter Gefrierschnitt. Originalvergrößerung 100 x. Eigenes Präparat.

In der Tela Submucosa ist ein Lymphfollikel mit zahlreichen Lymphozyten zu sehen (siehe Pfeil) und auch in der Lamina propria mucosae sind viele Lymphozyten vorhanden (siehe Pfeilkopf).

Die Prostaglandinsynthase 2 (PTGS2), auch Cyclooxygenase-2 (COX-2) genannt, scheint eine Schlüsselstellung zu haben beim Übergang von der Entzündung zur Tumorentstehung.³⁹ Sie ist für die Synthese der Prostaglandine zuständig, die an Entzündungsvorgängen beteiligt sind und in frühen Stadien der Tumorentstehung eine Rolle spielen.^{50,93,94} COX-2 ist nur in bestimmten Organen vorhanden, zum Beispiel im zentralen Nervensystem, der Niere, den Augen. Die COX-2-Expression ist schnell induzierbar und wird streng reguliert.⁹⁵ COX-2 kann auch in Zelltypen exprimiert werden, in denen sie normalerweise nicht vorkommt. Das ist der Fall in Bereichen chronischer Entzündungen oder Tumore. An diesen Orten ist sie oft stark überexprimiert, zum Beispiel in Darmepithelzellen von entzündlichen Bereichen des Kolons bei Vorliegen einer CED und im kolorektalen Karzinom.^{95,96}

COX-2 scheint die Expression regulatorischer Proteine zu beeinflussen, die den Zellzyklus kontrollieren.⁵⁴ Es gibt Hinweise, dass COX-2 die Expression von Bcl-2 hochreguliert, was zu einer reduzierten Apoptose führt.⁹⁷ Außerdem fördert COX-2 die Proliferation⁹⁸ und hemmt die Apoptose in Darmepithelzellen.⁹⁹ Es wird beschrieben, dass sie außerdem die Angiogenese und die Metastasierung von Tumoren fördert.¹⁰⁰

Zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen werden COX-2-Inhibitoren eingesetzt, wie zum Beispiel Celecoxib oder Sulindac. Sie gehören zu den nichtsteroiden entzündungshemmenden Medikamenten (NSAIDs = nonsteroidal anti-inflammatory drugs).^{101,102,103} Celecoxib und Sulindac bekämpfen die Entzündung und haben noch weitere Effekte: Sie bewirken eine Rückbildung der Polypen bei Patienten mit FAP^{33,104,105} und hemmen das Tumorstadium.¹⁰⁶ Auch Aspirin gehört zu den NSAIDs. Studien besagen, dass eine langfristige Einnahme von Aspirin das Risiko eines kolorektalen Karzinoms senkt.¹⁰⁷ Wegen möglicher schädlicher Nebenwirkungen wird die Einnahme zur Prävention von Tumoren nicht empfohlen. Anhand der Wirkungen der NSAIDs wird jedoch der enge Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumorentstehung deutlich, wobei COX-2 eine zentrale Rolle spielt.

Eine große Bedeutung beim Übergang von der Entzündung zum Tumor hat auch der Transkriptionsfaktor NF-kappaB (Nuclear Factor of kappaB). Er reguliert über 100 Gene,¹⁰⁸ von denen die meisten an entzündlichen Vorgängen beteiligt sind, darunter auch COX-2 und NOS2.³³ NF-kappaB hat bei der Immunantwort wichtige Funktionen und kontrolliert Proliferation und Apoptose. In Zellen, die dabei sind, sich zu Tumorzellen zu entwickeln, scheint NF-kappaB die Apoptose zu verhindern. Außerdem sorgt er für eine gesteigerte Produktion proentzündlicher Cytokine in den Entzündungszellen.^{87,109} Bei chronischen Entzündungen und in manchen Tumoren ist NF-kappaB ständig aktiv.¹¹⁰ Er scheint daran beteiligt zu sein, dass sich aus der chronischen Entzündung ein Tumor entwickelt.¹⁰⁹ In entzündeter Darmschleimhaut konnte aktives NF-kappaB in situ nachgewiesen werden. Es ist in Makrophagen in der Lamina propria und in Epithelzellen des entzündeten Bereichs lokalisiert und die Anzahl an Zellen mit positivem Nachweis ist umso größer, je stärker der Grad der Entzündung ist. In nicht entzündeter Darmmukosa ist es kaum vorhanden.¹¹¹

In vitro- Untersuchungen mit Darmtumorzellen zeigen, dass die Überexpression von COX-2 einhergeht mit einer Überexpression von IL6 und NF-kappaB.⁹⁵ Es wird angenommen, dass IL6 über die Bindung an den IL6-Rezeptor dazu beiträgt, dass NF-kappaB in den Nucleus wandert und dort an bestimmte Promotorsequenzen bindet.⁹⁵ Zu diesen Zielgenen gehört unter anderem COX-2.³³

Das entzündungsspezifische Cytokin Interleukin-6 (IL6), welches von Makrophagen, Fibroblasten und Tumorzellen produziert wird, ist sowohl in chronisch entzündlichen Bereichen¹¹² wie auch im Kolonkarzinom überexprimiert.^{113,114} Cytokine haben eine zentrale Funktion bei der Immunreaktion und sind wichtig bei der Abwehr der Entstehung von Tumoren. Trotzdem passiert es häufig, dass Tumorzellen der Immunabwehr entgehen.¹¹⁵ Anhand des niedrigen Caspase-3- und erhöhten Bcl-2-Spiegels konnte in kolorektalen Tumoren nur geringe Apoptose nachgewiesen werden. Dagegen zeigten ins Tumorgewebe eingedrungene mononukleäre Zellen des Immunsystems eine deutlich gesteigerte Apoptose im Vergleich zu jenen Zel-

len im Normalgewebe. Eine veränderte Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen, wie Bcl-2 und Caspase-3, der ins Tumorgewebe eingedrungenen mononukleären Zellen könnte ein Grund sein, warum die Tumorzellen nicht vom Immunsystem zerstört werden.¹¹⁶

Entzündungsregulierende Moleküle, wie zum Beispiel Cytokine, werden nicht nur von den Immunzellen oder von den von der Entzündung betroffenen Zellen produziert, sondern auch von Tumorzellen. Das trifft zu auf TNF-alpha und IL6. Es gibt immer mehr Hinweise, dass TNF-alpha wie auch IL6 die Tumorentstehung fördern.⁸⁷ IL6 scheint das Wachstum von Kolonkarzinomzellen anzuregen.¹¹⁷ Es gibt Studien, die zeigen, dass Menschen mit der genetischen Veranlagung, einen hohen IL6-Spiegel zu produzieren, eine geringere Wahrscheinlichkeit haben, ein sehr hohes Lebensalter zu erreichen und im Fall einer Tumorerkrankung eine schlechtere Prognose haben.¹¹⁸ Tumorzellen produzieren auch Cytokine mit immunsuppressiver Wirkung, wie zum Beispiel TGF- β und IL10, was ebenfalls ein Grund sein kann, warum die Tumorzellen den Angriff des Immunsystems überleben. Auch der Expression von IL6 in Tumorzellen konnte eine immunsuppressive Wirkung zugeschrieben werden.^{119,120} Trotz des tumorfördernden Potentials einiger Cytokine¹²¹ sind diese für das Überleben des Organismus unverzichtbar, da sie zentrale Funktionen im Immunsystem haben.

Die Entzündung ist eine wichtige Reaktion des Immunsystems, den Organismus vor pathogenen Mikroorganismen oder schädlichen Fremdstoffen zu schützen. Die in den Ort der Entzündung einwandernden Immunzellen haben die Aufgabe, die eingedrungenen Mikroorganismen zu zerstören und die Reparatur von geschädigtem Gewebe in Gang zu setzen. Dabei setzen sie eine Vielzahl entzündungsspezifischer chemischer Botenstoffe und Cytokine frei. Makrophagen, die eine zentrale Rolle bei chronischen Entzündungen haben, produzieren neben Cytokinen auch Wachstumsfaktoren, die die Proliferation anregen, was für eine schnelle Erneuerung von zerstörtem Gewebe sorgt. Von den Immunzellen abgegebene Cytokine, entzündungsspezifische Botenstoffe und Enzyme sorgen für ein verändertes Milieu der von der Entzündung betroffenen Zellen. Dieses veränderte Milieu kann am Ort der Entzündung ein erhöhtes Tumorrisiko mit sich bringen.⁸⁷

Es gilt inzwischen als erwiesen, dass bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine gestörte Immunreaktion im Darm für die Krankheit mitverantwortlich ist.¹²² Die gestörte Immunreaktion äußert sich in der Weise, dass die Abwehr gegenüber Bakterien und Darminhalt übermäßig aktiv ist. Auch körpereigene, nicht pathogene Bakterien werden angegriffen. Das Gleichgewicht zwischen Immunabwehr und Immuntoleranz gegenüber dem Darmmilieu, das existentiell wichtig ist für die Gesunderhaltung des Darms, ist zu sehr in Richtung Abwehr verschoben.^{123,124} Dieser Prozess ist verbunden mit Entzündungen und Schädigungen des Darmepithels. Im Zuge der Erneuerung des betroffenen Gewebes kommt es zu einer gesteigerten Proliferation. Dadurch erhöht sich die Gefahr, dass Zellen mit krebserregendem Potential entstehen. Durch Fehler bei der Replikation und Zellteilung können zum Beispiel Punktmutationen und Aneuploidien auftreten. Infolgedessen steigt das Tumorrisiko. Zudem haben Tumorzellen Strategien entwickelt, der Immunabwehr zu entgehen.

2. Zielsetzung

Eine Beziehung zwischen chronischen Entzündungen des Darms und der Entstehung von Darmtumoren ist schon seit langem erkannt worden; 1925 wurde erstmals über ein Kolonkarzinom bei einem CED-Patienten berichtet.¹²⁵ Trotzdem ist der molekularbiologische Hintergrund noch nicht ganz verstanden. Es gibt mehrfach Hinweise auf unterschiedliche Entstehungsmechanismen der CED-bedingten und sporadischen Kolonkarzinome.^{125,126} Diese Unterschiede können damit erklärt werden, dass bei CED-Patienten aufgrund der chronischen Entzündung eine völlig andere biochemische Situation im betroffenen Darmepithel vorliegt als bei Menschen ohne Darmerkrankung. Die chronische Entzündung wird als ein maßgeblicher Faktor der CED-bedingten Tumorentstehung angesehen.

Bei CED-bedingten und sporadischen Kolonkarzinomen spielen Mutationen in den Genen p53, APC und k-ras eine wichtige Rolle. Auch Deletionen, Aneuploidien und Mikrosatelliteninstabilität sind als Ursachen der Tumorentstehung bei CED-bedingten und sporadischen Kolonkarzinomen identifiziert worden.¹²⁷ Es gibt aber Unterschiede in der Häufigkeit und dem zeitlichen Auftreten dieser genetischen Veränderungen.^{72,73,74} Es herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass eine verhinderte Apoptose von Zellen, die ein krebserregendes Potential in sich tragen, zur Tumorentstehung führt.²⁸

Während bei den sporadischen Kolonkarzinomen das Adenom die Vorstufe des Tumors darstellt, entstehen CED-bedingte Karzinome meistens über Dysplasien als Tumorstufe. Ein Problem bei der Überwachung des Tumorrisikos von CED-Patienten ist, die Dysplasien rechtzeitig zu erkennen und den Grad der Dysplasie richtig einzuordnen.^{128,129,77} In wenigen Fällen verläuft die Entstehung eines CED-bedingten Tumors nicht über die Dysplasie.¹³⁰

Deshalb wird versucht, zusätzlich zur koloskopischen Überwachung neue zuverlässige Methoden und Marker zu finden, die ein erhöhtes Tumorrisiko der CED-Patienten frühzeitig, zum Beispiel noch vor der Entstehung einer Dysplasie anzeigen.^{33,77} Solche zuverlässigen Marker stehen zur Zeit noch nicht zur Verfügung. Der Grund hierfür könnte sein, dass anscheinend auch den CED-bedingten Tumoren, wie den sporadischen, mehrere verschiedene molekularbiologische Entstehungsmechanismen zugrunde liegen.¹²⁵

Es gibt Hinweise, dass das Tumorsuppressorgen p53 ein früher Marker für CED-bedingte Tumore sein könnte. Mutationen in p53 treten bei der Colitis-assoziierten Tumorentstehung bereits in den Dysplasien und sogar noch vor Entstehung der Dysplasie auf.^{76,79}

Ein weiterer Marker, der frühzeitig ein erhöhtes Tumorrisiko im Darmepithel von CED-Patienten anzeigen könnte ist Bcl-2. Bezüglich der Bcl-2-Expression in CED-bedingten und sporadischen Kolonkarzinomen gibt es jedoch widersprüchliche Daten.^{85,86}

Survivin könnte sich ebenfalls als nützlicher Tumormarker für Colitis-assoziierte Tumore erweisen, denn es wird über eine erhöhte Survivin-Expression in CED-bedingten im Vergleich zu sporadischen Kolonkarzinomen berichtet.⁸⁶

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression von p53, Bcl-2 und Survivin auf Proteinebene in situ und auf RNA-Ebene untersucht werden. Zusätzlich wird auf RNA-Ebene die Expression von β -Catenin, COX-2, IL6 und Musashi-1 nachgewiesen. Musashi-1 wird im Stammzellbereich der Krypten des Kolonepithels exprimiert und spielt vermutlich eine Rolle bei der Zellteilung. β -Catenin kann innerhalb des Wnt-Signalwegs über die Aktivierung bestimmter Zielgene zu einer gesteigerten Proliferation führen. COX-2 ist ein zentrales Enzym beim Übergang von der Entzündung zum Tumor und IL6 wird sowohl in chronisch entzündlichem Gewebe wie auch im Kolonkarzinom überexprimiert.

Das Untersuchungsmaterial ist normales Kolonepithel von Menschen ohne CED, von CU oder MC betroffenes Kolonepithel von Menschen mit einer CED, Kolonpolyp- und Kolontumorgewebe von Menschen ohne CED.

Aufgrund des Vergleichs der Expression der oben genannten Gene in den vier Untersuchungsgruppen soll dazu beigetragen werden aufzuklären, inwiefern diese Gene mit der Entstehung eines CED-bedingten Tumors in Zusammenhang stehen.

Es soll herausgefunden werden, ob sich diese Gene als frühe Marker für ein CED-bedingtes Tumorrisiko eignen.

3. Proben, Material und Methoden

3.1. Proben

Die Proben sind Biopsien des Kolonepithels von Menschen ohne CED, von CU- und MC-Patienten, Darmpolypen von Menschen ohne CED und Darmtumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Die Darmepithelproben der CU-Patienten beinhalten auch Polypen, Pseudopolypen, entzündliches und nicht entzündliches Gewebe. Das Kolontumorgewebe stammt von größeren Gewebestücken aus operativen Eingriffen. Alle anderen Proben sind Biopsien aus endoskopischen Untersuchungen. Die Proben werden nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert.

Die Proben stammen von Menschen verschiedenen Alters und in unterschiedlicher gesundheitlicher Verfassung. Bei manchen CED-Patienten besteht eine langjährige CU oder MC, bei anderen ist die CED erst seit kurzem diagnostiziert worden. Die Biopsie-Entnahme erfolgte während eines akuten Krankheitsschubs oder in der Phase einer Remission. Einige der Patienten sind mit entzündungshemmenden Medikamenten therapiert worden.

3.2. Material

3.2.1. Geräte

Backofen: „FUNCTION Line“, Firma Heraeus Instruments

Digitalkamera, EOS D60, Firma Canon

Eismaschine zur Eisherstellung, Firma Ziegra

Electronic Timer Clock

Fluoreszenzmikroskop mit zugehöriger Software und angeschlossenem Computer:
Axiovert 200M, Firma Zeiss

Gefrierschrank (-80°C und -20°C)

Homogenisator, batteriebetrieben: Homogenizer, Firma Biospec Products

Kryostat: 2800 FRIGOCUT E, Firma Reichert-Jung

Kühlschrank (ca. 4°C)

Licht-/Fluoreszenzmikroskop: Axioskop 50, Firma Zeiss

Real Time PCR-Gerät: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Firma Applied Biosystems

Spektrophotometer: GeneQuant II, RNA/DNA Calculator, Firma Pharmacia Biotech

Thermoblock: eppendorf Thermomixer 5436, Firma Eppendorf

Tischzentrifuge: eppendorf Centrifuge 5415 D, Firma Eppendorf

Vortexer: Minishaker MS 2, Firma Ika Works, Inc.

Zentrifuge für PCR-Platten: ROTIXA/A, Firma Hettich

3.2.2. Gebrauchsmaterial

Behälter mit Deckel und Objektträgerhalterung für die IHC, „feuchte Kammer“

Dako Pen, Firma Dako

Deckgläser, 24 x 60 mm, Firma Knittel

Eppendorf-Pipetten, Reference^R (Variabel), 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Firma Eppendorf

Eppendorf-Pipettenspitzen: epTIPS, Reloads, PCR clean, 0,5-20 µl L; 2-200 µl; 50-1000 µl, Firma Eppendorf

Eppendorf-Tubes: Safe-Lock Tubes, 1,5 ml und 2,0 ml, PCR clean, Firma Eppendorf

Erlenmeyerkolben, 300 ml, Firma Schott

Färbegestell, für 10 Objektträger 76 x 26 mm, mit Drahtbügel, Firma Schütt Labortechnik

Färbetrog, für 16 Objektträger (8 Paare Rücken an Rücken), Firma Schütt Labortechnik

Falcon-Röhrchen: FALCON^R Blue MaxTM, 50 ml, aus Polypropylen, steril, Firma Becton Dickinson

Flüssigstickstoffvorratsbehälter, Firma KGW Isotherm

Fluoreszenz-Küvette, für Fluometrie, 45 mm hoch, 12,5 mm breit, Quarzglas SUPRASIL^R, Einsatzbereich 200 - 2500 nm, Firma Schütt Labortechnik

Glaskasten, zur Aufnahme des Färbegestells, Firma Schütt Labortechnik

Handschuhe, Peha-soft, powderfree, 100 Stück, Firma Hartmann

Isolierbehälter für Eis, aus Polystyrol, Schütt Labortechnik

Objektträger, 76 x 26 mm, Mattrand, Firma Knittel

Parafilm, „Laboratory Film“, Firma American National Can

PCR-Platten: 96 Well Multiply^R-PCR Plate, Firma Sarstedt

PCR-Platten-Cover: AbsoluteTM QPCR Seal Sheets, Firma ABgene

Pestillen, „Pellet Pestle“, passend für den Homogenisator, für 1,5 ml-Tubes, aus Polypropylen, autoklavierbar, Firma Kontes

Pinzette

Präparatekasten, für Objektträger 76 x 26 mm, Firma Schütt Labortechnik

Reaktionsgefäßständer

Schere

Schraubflasche, 1 l, Firma Schott

Skalpell: „Disposable Scalpel“, steril, Firma Feather

3.2.3. Chemikalien, Substanzen, Kits

Aceton, zur Analyse, 1 l, Firma AppliChem

Alkohol, vergällt, zur Desinfektion, Alkopharm 80, Firma Brüggemann

Ampuwa^R, 1000 ml, Firma Fresenius Kabi

Aqua bidest.

Dako REALTM EnVisionTM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, 500 Tests

Dako REALTM Peroxidase-Blocking Solution

DAPI, 10 mg, Firma Invitrogen

Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade, 4 x 250 µl, Firma Roche

Desinfektionsmittel für den Kryostat, Leica CRYOFECT, 250 ml, Firma Leica

DTT, 0,1M, Firma Invitrogen

Ethanol, absolut, zur Analyse, 1 l, Firma Merck

Fluorescent Mounting Medium, Firma Dako

flüssiger Stickstoff

Kaisers Glyceringelatine, für die Mikroskopie, 100 g, Firma Merck

Mayers Hämalaulösung, für die Mikroskopie, 500 ml, Firma Merck

Mercaptoethanol, 50 ml, Firma Merck

M-MLV Reverse Transcriptase, 200u/µl, 40000u, Firma Invitrogen

PBS Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Firma Biochrom

Platinum^R SYBR^R Green qPCR SuperMix UDG, 500 reactions, Firma Invitrogen

Primer p(dT)₁₅ for cDNA synthesis, 40 µg, Firma Roche

Protein-Block Serum-Free, Firma Dako

QIAshredderTM Homogenizer (250), Firma Qiagen

RNasin^R Ribonuclease Inhibitor, 2500u, Firma Promega

RNeasy^R Mini Kit (250), Firma Qiagen

RT-Puffer, 5 x, Firma Invitrogen

Tissue-Tek^R O.C.T.TM COMPOUND, 125 ml, Firma Sakura

3.2.4. Antikörper für die IHC

Primärantikörper:

Actin rabbit IgG, anti-human, 12,7 mg/ml, empf. Verdünnung 1:400, Cat.No. A5060, Firma Sigma-Aldrich, eingesetzte Konzentration 31,75 µg/ml

β-Catenin rabbit IgG (H-102), anti-human, mouse, rat, zebrafish, xenopus, 200 µg/ml, empf. Verdünnung. 1:100, Cat.No. sc-7199, Firma Santa Cruz, eingesetzte Konzentration 2,0 µg/ml

Bcl2 mouse IgG, monoclonal, anti-human, 260 µg/ml, empf. Verdünnung 1:100, Cat. No. M0886, Firma Dako, eingesetzte Konzentration 2,6 µg/ml

p53 mouse IgG, monoclonal, anti-human, 390 µg/ml, empf. Verdünnung, 1:100, Cat. No. M7001, Firma Dako, eingesetzte Konzentration 3,9 µg/ml

Survivin goat IgG (C-19), anti-human, 200 µg/ml, empf. Verdünnung. 1:100, Cat.No. sc-8807, Firma Santa Cruz, eingesetzte Konzentration 2,0 µg/ml

Negative Control, mouse IgG1, gegen Glucoseoxidase von Aspergillus niger, 100 µg/ml, Cat. No. X0931, Firma Dako

Normal goat IgG, Negativkontrolle, 400 µg/ml, Cat.No. sc-2028, Firma Santa Cruz

Sekundärantikörper:

Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG, 2 mg/ml, 0,5 ml, highly cross adsorbed against bovine, goat, rabbit, rat, human; empf. Verdünnung 1:400, Cat.No. A21424, Firma Invitrogen, eingesetzte Konzentration 5,0 µg/ml

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, 2 mg/ml, 0,5 ml, highly cross adsorbed, against bovine, goat, mouse, rat, human; empf. Verdünnung 1:200, Cat.No. A11034, Firma Invitrogen, eingesetzte Konzentration 10,0 µg/ml

Alexa Fluor 555 donkey anti-goat IgG, 2 mg/ml, 0,5 ml, adsorbed against rabbit, rat, mouse, human; empf. Verdünnung 1:400, Cat.No. A21432, Firma Invitrogen, eingesetzte Konzentration 5,0 µg/ml

3.2.5. Primer für die Real Time PCR

Die Primer (siehe Tabelle 1) werden nach eigener Anweisung synthetisiert von der Firma MWG Biotech AG, 85560 Ebersberg. Sie werden im HPSF-Verfahren (high purity salt free) synthetisiert und in lyophilisiertem Zustand geliefert. Nach Ankunft werden sie sofort in Ampuwa gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl (100 µM) eingestellt. Von dieser Stammlösung wird ein Aliquot gebrauchsfertige Lösung durch nochmalige Verdünnung mit Ampuwa auf 5 pmol/µl (5 µM) hergestellt.

Gen und Accession Number	Primersequenz und Ampliconeigenschaften
β-Catenin NM_001904	forward Primer 5'-GACACAGCAGCAATTTGTGGAG-3' reverse Primer 5'-CAATTCGGTTGTGAACATCCC-3' Schmelztemp. und Länge des Amplicons: 81°C, 101 bp
β2-Mikroglobulin NM_004048	forward Primer 5'-GGCTATCCAGCGTACTCCAAAG-3' reverse Primer 5'-CAACTTCAATGTCGGATGGATG-3' Schmelztemp. und Länge des Amplicons: 78°C, 116 bp
Bcl-2 NM_000633	forward Primer 5'-ATGACTGAGTACCTGAACCGGC-3' reverse Primer 5'-GCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3' Schmelztemp. und Länge des Amplicons: 83°C, 115 bp
COX-2 NM_000963	forward Primer 5'-GAATGTTCCACCCGCAGTACA-3' reverse Primer 5'-GCATAAAGCGTTTGCGGTACTC-3' Schmelztemp. und Länge des Amplicons: 78°C, 101 bp
IL6 NM_000600	forward Primer 5'-AATTCGGTACATCCTCGACGG-3' reverse Primer 5'-GGTTGTTTTCTGCCAGTGCCT-3' Schmelztemp. und Länge des Amplicons: 79°C, 101 bp
Musashi-1 NM_002442	forward Primer 5'-ATAAAGTGCTGGCGCAATCG-3' reverse Primer 5'-TCGTTTCGAGTACCATCTTGG-3' Schmelztemp. und Länge des Amplicons: 83°C, 102 bp
p53 NM_000546	forward Primer 5'-CCCAGCCAAAGAAGAAACCAC-3' reverse Primer 5'-TGAGTTCCAAGGCCTCATTCA-3' Schmelztemp. und Länge des Amplicons: 81°C, 105 bp
Survivin NM_001168	forward Primer 5'-AAAGCATTTCGTCGGTTGC-3' reverse Primer 5'-GCACTTTCTTCGCAGTTTCCT-3' Schmelztemp. und Länge des Amplicons: 76°C, 161 bp

Tabelle 1: Primer für die Real Time PCR.

3.3. Methoden

3.3.1. Gefrierschneiden am Kryostat

Von den Proben werden am Kryostat bei -20°C 6-7 μm dicke Gefrierschnitte hergestellt und auf Objektträger überführt. Um die Proben schneiden zu können, werden sie auf Metallblöcken mit O.C.T-Compound fixiert. Die Gefrierschnitte werden ca. 15 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann bei -20°C gelagert bis zu ihrer weiteren Verwendung.

3.3.2. Immunfluoreszenzfärbung

Die bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte werden bei Raumtemperatur ca. drei Minuten aufgetaut, dann für 5 min in Aceton fixiert. Danach werden sie einige Minuten an der Luft getrocknet. Währenddessen werden die Objektträger beschriftet und die Präparate mit dem Dako Pen umkreist. Danach folgt eine fünfminütige Inkubation in PBS. Dabei löst sich das O.C.T-Compound, das die Gefrierschnitte umgibt, auf. Die Gefrierschnitte werden in der feuchten Kammer für 10 min mit dem „Protein-Block Serum-Free“ inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers ans Präparat zu verhindern. Daraufhin wird wieder für fünf min in PBS gewaschen. Die Gefrierschnitte werden in die feuchte Kammer auf die Objektträgerhalterung gelegt und mit dem Primärantikörper in der geeigneten Verdünnung (siehe Kapitel 3.2.4.) bei geschlossenem Deckel für 20 h bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Bei einer Doppelfärbung mit zwei Primärantikörpern werden die beiden Antikörper gemischt, wobei jeder die richtige Verdünnung im Endvolumen aufweisen muss. Verdünnt wird mit PBS. Die beiden Primärantikörper müssen aus unterschiedlichen Organismen stammen, zum Beispiel aus Maus und Kaninchen. Die Negativkontrolle wird nicht mit dem Primärantikörper inkubiert, sondern mit einem Antikörper, der aus demselben Organismus wie der Primärantikörper stammt, aber gegen ein pflanzliches Protein gerichtet ist („Negative Control mouse IgG1“ von Dako bei Primärantikörpern aus der Maus oder „Normal goat IgG“ von Santa Cruz, wenn der Primärantikörper aus der Ziege kommt). Der Negativkontrollantikörper muss auf dieselbe Konzentration wie der Primärantikörper verdünnt werden. Das Zielprotein der Negativkontrolle kommt im Präparat nicht vor, so dass es keine Reaktion geben sollte.

Nach der 20stündigen Inkubation wird die Antikörperlösung von den Objektträgern abgeschüttelt und diese dreimal 5 min in PBS gewaschen. Dann folgt eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und im Dunkeln in der feuchten Kammer mit dem passenden Sekundärantikörper, der vorher mit PBS geeignet verdünnt wurde (siehe Kapitel 3.2.4.). Bei einer Doppelfärbung mit zwei Primärantikörpern wird mit der Mischung der zwei passenden Sekundärantikörper inkubiert. Dabei muss auf eine eventuelle Kreuzreaktivität geachtet werden, damit die Sekundärantikörper nicht aneinander binden. Um Kreuzreaktivität zu vermeiden, werden bei der Doppelfärbung mit Primärantikörpern aus Ziege und Kaninchen nacheinander mit den Sekundärantikörpern inkubiert, und zwar zuerst 1 h mit dem gegen die Ziege gerichteten Sekundärantikörper und danach 1 h mit dem gegen das Kaninchen gerichteten Sekundärantikörper, da dieser aus der Ziege stammt. Andernfalls würde der gegen die Ziege gerichtete Sekundärantikörper an den aus der Ziege stammenden Sekundärantikörper binden. Nach der Inkubation mit dem ersten Sekundärantikörper werden die Präparate gründlich dreimal 5 min in PBS gewaschen, um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen.

Nach der Inkubation mit den Sekundärantikörpern, die im Dunkeln durchgeführt werden muss, da die fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper lichtempfindlich sind, werden die Präparate zweimal 5 min in PBS gewaschen. Danach folgt eine dreiminütige Inkubation in der feuchten Kammer mit der geeigneten Verdünnung des DAPI-Farbstoffs (siehe

Kapitel 3.2.4.), was eine Blaufärbung der Zellkerne bewirkt. Anschließend wird der DAPI-Farbstoff abgeschüttelt und die Präparate 5 min in der Glasküvette in PBS gewaschen. Das PBS wird abgegossen und es wird kurz in bidestilliertem H₂O gewaschen. Danach werden die Präparate für ca. 30 min senkrecht an der Luft getrocknet und dann mit einem Fluorescent Mounting Medium eingedeckt. Bei 4°C im Kühlschrank gelagert hält sich die Fluoreszenzfärbung einige Monate.

Die Analyse der Fluoreszenzfärbung der Präparate erfolgt am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma Zeiss. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt in drei Kanälen: DAPI wird mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt und wird detektiert bei 450 nm (blau). Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 wird angeregt bei 470 nm und wird detektiert bei 550 nm (grün) und Alexa Fluor 555 wird angeregt bei 545 nm und wird detektiert bei 670 nm (orange). Mit der zum Mikroskop zugehörigen Software „Axio Vision Rel.4-2“ von Zeiss wird die Fluoreszenzfärbung in den drei Kanälen am Computer digital als Bild gespeichert, sowohl für jeden Kanal einzeln wie auch als Darstellung der Dreifachfärbung in allen drei Kanälen gemeinsam. Das auf dem Computerbildschirm zunächst als Graustufenbild gezeigte Fluoreszenzsignal wird sofort in ein Farbbild mit schwarzem Hintergrund umgewandelt. Die Zuordnung einer bestimmten Farbe zum jeweiligen Kanal muss im Programm nur einmal vorab bestimmt werden und erfolgt dann automatisch immer auf die gleiche Weise. Das so erhaltene Fluoreszenzbild wird anschließend invertiert, so dass sich das Fluoreszenzsignal vom weißen Hintergrund abhebt und dadurch besser sichtbar ist.

3.3.3. Peroxidasefärbung

Die Vorgehensweise ist zu Anfang identisch mit der bei der Immunfluoreszenzfärbung bis zur ersten fünfminütigen Inkubation in PBS. Dann werden die Gefrierschnitte in der feuchten Kammer für 10 min mit der „Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution“ inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Dann wird zweimal 5 min in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, werden die Gefrierschnitte für 10 min mit dem „Protein-Block Serum-Free“ inkubiert. Danach wird wieder zweimal 5 min in PBS gewaschen. Die nachfolgende 20stündige Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgt genauso wie bei der Immunfluoreszenzfärbung. Dann wird dreimal 5 min in PBS gewaschen.

Der Sekundärantikörper ist Bestandteil des „Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse“. Fläschchen A beinhaltet Dextran-Polymere, an die Peroxidase-Moleküle und Antikörper aus der Ziege, gerichtet gegen Maus- und Kaninchen-Immunglobuline gekoppelt sind. Die Präparate werden in der feuchten Kammer 30 min mit der Lösung aus Fläschchen A inkubiert, dann dreimal 5 min in PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wird eine Mischung des wasserstoffperoxidhaltigen „Dako REAL™ Substrate Buffer“ (Fläschchen B) und des „Dako REAL™ DAB+ Chromogen“ (Fläschchen C) in der benötigten Menge hergestellt. Es wird im Verhältnis 50:1 gemischt, da die Lösung in Fläschchen C 50fach konzentriert ist, zum Beispiel 1 ml Lösung B + 20 µl Lösung C. Nach dem Waschen in PBS werden die Objektträger in die feuchte Kammer gelegt und die vorher gemischte DAB-haltige Substrat-Arbeitslösung wird auf die Präparate pipettiert. Am Ort des Zielantigens wird das Wasserstoffperoxid durch die mit dem Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase gespalten, dabei wird das DAB zu einem braunen Produkt oxidiert. Nach Eintritt der Braunfärbung am Ort des Zielantigens, zum Beispiel nach 30 bis 60 sec, werden die Objektträger einige Minuten in Leitungswasser gewaschen.

Anschließend werden die Präparate zur Blaufärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaunlösung ca. 6 sec inkubiert und dann für 10 min in Leitungswasser gewaschen. Die Präparate werden ca. 30 min senkrecht an der Luft getrocknet und dann in Kaisers Glycingelatine eingedeckt. Die Auswertung erfolgt am Axioskop 50 von Zeiss. Mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera, die vom mit der Kamera verbundenen Computer mit der

Software „Remote Capture“ von Canon gesteuert wird, werden die Präparate fotografiert und als digitale Bilder gespeichert. Die Präparate werden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.3.4. RNA-Extraktion und photometrische Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Extraktion wird mit dem „RNeasy^R Mini Kit“ von Qiagen durchgeführt. Mit dieser Methode werden RNA-Moleküle isoliert, die größer als 200 Nukleotide sind, so dass man hauptsächlich mRNA als Produkt erhält. Die bei -80°C gelagerten Proben werden zum Transport auf Eis gestellt und dann möglichst schnell in den gekühlten RLT-Puffer überführt. Der RLT-Puffer enthält Guanidin-Isothiocyanat, das RNasen inaktiviert. Vor der Verwendung wird die benötigte Menge RLT-Puffer mit Mercaptoethanol versetzt und gevortext: 1 ml RLT-Puffer + 10 µl Mercaptoethanol. Jede Probe wird in 300 µl des RLT-Puffer/Mercaptoethanol-Gemisches mit dem Homogenisator im 1,5 ml-Eppendorf-Tube gründlich zerkleinert. Die homogenisierte Probenlösung wird gevortext und auf eine QIAshredderTM-Säule gefüllt. Die Säulen werden zur weiteren Zerkleinerung und Abtrennung größerer Bestandteile bei Raumtemperatur und 13000 rpm für 2 min zentrifugiert. Auch alle weiteren Zentrifugationsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zum Durchfluss wird ein Volumen (300 µl) 70%iges eisgekühltes Ethanol zugegeben um die Nukleinsäuren auszufällen und die nachfolgende Bindung der RNA in der RNeasy Mini-Säule zu erleichtern. Die Lösung wird sofort mit der Pipette gemischt und auf eine RNeasy Mini-Säule, die in einem 2,0 ml-Tube steckt, pipettiert. Die Säulen werden bei 11000 rpm 15 sec zentrifugiert. Dabei bindet die RNA an die Silikat-Membran der Säule. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule in den 2,0 ml-Tube zurückgesteckt. Zum Waschen werden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert. Es wird bei 11000 rpm 15 sec zentrifugiert. Der Tube mit dem Durchfluss wird verworfen und die Säule wird in ein neues 2,0 ml-Tube gesteckt. Dann folgt ein zweimaliges Waschen mit 500 µl RPE-Puffer mit nachfolgendem Zentrifugieren bei 11000 rpm für 15 sec bzw. 11000 rpm für 2 min.

Nach dem Zentrifugieren wird der Durchfluss verworfen. Die Säule wird auf ein beschriftetes 1,5 ml-Tube gesteckt. Der ebenfalls beschriftete Deckel wird abgeschnitten. Es werden 40 µl Ampuwa (RNase-freies Wasser) genau auf die Silikatmembran der Säule pipettiert, um die RNA zu eluieren. Dann wird bei 12000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die RNA ist nun im Durchfluss. Die Säule wird verworfen und der Tube wird mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen und bis zur Messung der RNA-Konzentration auf Eis gestellt.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt an einem Spektrophotometer durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Um Verunreinigungen festzustellen wird auch bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, bei 230 nm, dem Absorptionsmaximum von Salzen und bei 320 nm, dem Absorptionsmaximum von Phenolen gemessen. Eine Absorption von $A_{260}=1$ entspricht bei einer Messung in Wasser einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Es wird in einer 1 ml Quarzküvette gemessen, die einen Volumendurchmesser von 1 cm hat. Die RNA-Probe wird um $1/100$ in Wasser verdünnt und das Spektrophotometer wird vor der RNA-Messung mit Wasser auf den Nullwert geeicht. Es gilt nach dem Lambert-Beer-Gesetz:

$$\text{Konzentration der RNA-Probe} = 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich wird die Reinheit der RNA bestimmt durch Messung des Verhältnisses A_{260}/A_{280} . Reine RNA hat einen A_{260}/A_{280} -Wert von 2,0.

3.3.5. Reverse Transkription

Um in der Real Time PCR als Template verwendet zu werden, muss die mRNA vorher in cDNA umgeschrieben werden. Für die Reverse Transkription werden 2 µg RNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt (Endkonz. 0,04 µg/µl). Ausgehend von der gemessenen RNA-Konzentration wird das entsprechende Volumen der RNA-Probe auf 17 µl mit Ampuwa aufgefüllt. Es werden 10 µl des 10µM Oligo(dT)₁₅ Primer hinzugefügt (Endkonz. 2 µM). Das RNA/Primer-Gemisch wird bei 65°C unter Schütteln für 5 min im Thermoblock inkubiert, damit sich Sekundärstrukturen der RNA lösen. In der Zwischenzeit wird die benötigte Menge an RT-Mix angesetzt und auf Eis gestellt. Der Mix für eine Reaktion setzt sich zusammen aus 10 µl 5x RT-Puffer (Endkonz. 1x), 5 µl dNTP-Mix (10 mM jeder dNTP, Endkonz. 1 mM jeder dNTP), 5 µl 0,1 M DTT (Endkonz. 0,01 M), 1 µl RNasin (40 u /µl, Endkonz. 0,8 u /µl). DTT ist zur Stabilisierung der Transkriptase erforderlich, RNasin hemmt die Aktivität von RNasen. Nachdem das RNA/Primer-Gemisch auf Eis kurz abgekühlt worden ist, werden 21 µl des RT-Mix hinzugegeben. Es folgt eine 2minütige Inkubation bei 40°C im Backofen. Daraufhin werden in jeden Reaktionsansatz 2 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 u /µl, Endkonz. 8 u /µl) pipettiert. Der fertige Ansatz wird kurz gevortext und für 1,5 h bei 40°C im Backofen inkubiert. Anschließend folgt eine 15minütige Inkubation bei 70°C im Thermoblock, um die Reaktion zu stoppen. Zum Schluss wird die cDNA auf Eis gestellt, kurz herunterzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

3.3.6. Real Time PCR

Die Genexpression auf RNA-Ebene wird durch die hoch sensible Methode der Real Time PCR bestimmt. Die Vervielfältigung der eingesetzten cDNA kann in Echtzeit verfolgt werden anhand des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffs SYBR^R Green. Er bindet an doppelsträngige DNA und emittiert nur in gebundenem Zustand bei Anregung im Bereich 494 nm Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 521 nm. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge doppelsträngiger DNA und ist ein Maß für die vorhandene Menge amplifizierter DNA. Die Fluoreszenz wird während der gesamten Dauer der PCR im „ABI PRISM 7000 SDS“ Real Time PCR-Gerät gemessen und mit dem angeschlossenen Computer und der dazugehörigen Software „ABI Prism 7000 SDS“ von Applied Biosystems aufgezeichnet.

Durch Auftragen der Fluoreszenz gegen die Zeit (Anzahl der Runden) ergibt sich eine sigmoidale Kurve, da sich die Anzahl an Kopien des Templates in jeder Runde verdoppelt, was zu einem exponentiellen Anstieg führt, bis es zu einer Sättigung der Reaktion kommt (siehe Abb. 3-1).

Im Bereich der größten Steigung der Kurve liegt der c_T Wert (threshold cycle). Er ist definiert als diejenige Runde, bei der das Fluoreszenzsignal sich deutlich von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet.¹³¹ Dieser Wert wird während der PCR gemessen und gibt Aufschluss über die Menge der anfangs vorhandenen, eingesetzten cDNA, die mit Hilfe spezifischer Primer detektiert werden soll. Je kleiner der c_T Wert ist, desto größer war die Menge der anfangs vorhandenen zu detektierenden cDNA.

Da die Reaktion zwischen SYBR^R Green und doppelsträngiger DNA nicht sequenzspezifisch ist, ist es möglich, dass auch unerwünschte PCR-Produkte zur Fluoreszenzemission beitragen. Um überprüfen zu können, ob es sich beim PCR-Produkt um die gewünschte DNA handelt, wird am Ende der PCR eine Dissoziationskurve erstellt. Das geschieht durch langsames Aufheizen (0,1°C pro Sekunde) von 60°C auf 95°C, währenddessen die Fluoreszenzemission kontinuierlich gemessen wird. Am Schmelzpunkt des PCR-Produktes nimmt die Fluoreszenz plötzlich stark ab, da sich die DNA-Doppelstränge bei dieser Temperatur voneinander trennen. Jedes PCR-Produkt hat eine bestimmte Schmelztemperatur, die von dessen Länge und GC-Gehalt abhängt. Die PCR-Reaktion ist spezifisch, wenn nur ein Peak in

der Dissoziationskurve vorhanden ist und dieser bei der Schmelztemperatur des gewünschten PCR-Produktes liegt. Primer-Dimere und unspezifische PCR-Produkte können das Ergebnis verfälschen und sind erkennbar durch zusätzliche Peaks in der Dissoziationskurve, wobei die Peaks der Primer-Dimere immer vor dem des gewünschten Produktes liegen.

Parallel zu den PCR-Ansätzen mit Primern für das zu detektierende Gen wird als interner Standard eine PCR mit Primern für ein Housekeeping-Gen, und zwar β 2-Mikroglobulin, durchgeführt. β 2-Mikroglobulin hat sich für die Messung im Kolonepithel unter den am meisten verwendeten Housekeeping-Genen als am geeignetsten erwiesen.¹³² Housekeeping-Gene sind definiert als Gene, die in verschiedenen Gewebearten und Entwicklungsstadien in konstant gleichem Ausmaß exprimiert werden.¹³³ Setzt man die zwei c_T Werte, die man erhält aus der PCR für das zu detektierende Gen und aus der PCR für das Housekeeping-Gen miteinander in Beziehung, erhält man eine Quantifizierung der Expression des zu detektierenden Gens, relativ zur Expression des Housekeeping-Gens.

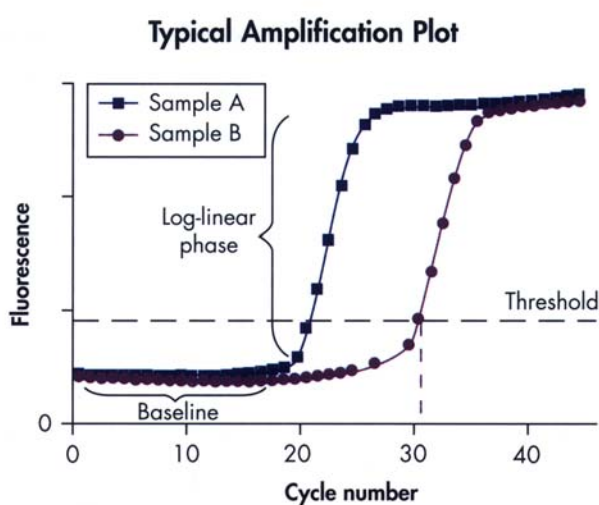


Abb. 3-1: Typische Amplifikationskurven der PCR. Die Kurven zeigen den exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz von zwei Proben (A und B). Probe A enthält eine größere Anfangsmenge der zu detektierenden DNA als Probe B.

Aus: Critical Factors for Successful Real-Time PCR. 01/2004. Handbuch von Qiagen.

Um eine mögliche Kontamination des Reaktionsansatzes zu erkennen, werden parallel zu den eigentlichen PCR-Ansätzen Negativkontrollen mitgeführt, die statt der cDNA als Template Wasser enthalten. Um Schwankungen der PCR aufzudecken, die verursacht werden durch die eingesetzte cDNA, werden Doppelkontrollen durchgeführt, das heißt es werden zwei völlig identische Reaktionsansätze nebeneinander in die 96 Well-Platte pipettiert.

Es werden 2,5 μ l cDNA als Template eingesetzt, die eine Konzentration von 0,01 μ g/ μ l hat. Die anfängliche Menge an gesamter cDNA beträgt also 25 ng. Da die mRNA während der Reversen Transkription im Verhältnis 1:1 in cDNA umgeschrieben wird, geht man von einer cDNA-Konzentration von 0,04 μ g/ μ l aus (2 μ g eingesetzte RNA / 50 μ l Reaktionsvolumen). Für die Real Time PCR wird daher die aus der Reversen Transkription erhaltene cDNA um $\frac{1}{4}$ mit Ampuwa verdünnt.

Je nach Anzahl der Reaktionen wird die benötigte Menge des PCR-Mix hergestellt. Der Mix für eine Reaktion setzt sich zusammen aus 13,0 μ l SYBR^R Green (gebrauchsfertig durch vorherige Zugabe des ROX-Reference Dye), 1,5 μ l 5 μ M Forward Primer, 1,5 μ l 5 μ M Reverse Primer und 6,5 μ l Ampuwa. In die 96 Well-Platte werden zuerst pro Loch 22,5 μ l des Mix pipettiert, dann 2,5 μ l der cDNA-Probe beziehungsweise 2,5 μ l Ampuwa bei den Negativkontrollen. Das Gesamtvolumen pro Reaktion beträgt 25 μ l.

Die PCR-Platte wird mit der Cover-Folie verschlossen und die Reaktionsansätze ca. 30 sec bei 3000 rpm in der PCR-Platten-Zentrifuge herunterzentrifugiert. Dann wird die Platte ins

PCR-Gerät gestellt und die PCR wird gestartet. Die Gesamtdauer der PCR beträgt 2 h und wird durchgeführt nach folgendem Programm:

95°C	2 min	1 Runde
95°C	15 sec	45 Runden
60°C	30 sec	

Das anfängliche Erhitzen auf 95°C aktiviert die Taq DNA-Polymerase (Hot Start PCR). In den folgenden 45 PCR-Runden erfolgt bei 95°C die Denaturierung, das heißt Trennung der Doppelstränge. Bei 60°C kommt es nach Bindung der Primer an die DNA zur Elongation, das heißt der Kettenverlängerung durch die Polymerase. Zum Schluss wird langsam (0,1°C pro Sekunde) auf 95°C hochgeheizt, um die Dissoziationskurve zu erstellen.

3.3.6.1. Konstruktion der Primer

Die Primer für die Real Time PCR müssen spezifisch sein für das zu detektierende Gen und dürfen nicht auch andere Gene oder eventuell vorhandene Pseudogene miterfassen. Ob die Primer ausschließlich zur Sequenz des gewünschten Gens komplementär sind wird im Internet kontrolliert mit Hilfe der Datenbank des National Institute of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA) auf der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. In der Suchmaske des „nucleotide blast“ wird die Basensequenz des Primers eingetragen und die Suche gestartet. Das Programm vergleicht die eingegebene Sequenz mit allen in der Datenbank gespeicherten Sequenzen. Als Ergebnis werden alle in der Datenbank gespeicherten DNA-Sequenzen angezeigt, zu denen der Primer komplementär ist. Werden außer dem gewünschten Gen auch noch andere Sequenzen erfasst, muss ein anderer Primer gewählt werden. Der BLAST Search (Basic Local Alignment and Search Tool) wird durchgeführt für den Forward- und den Reverse-Primer.

Da mit Hilfe der Real Time PCR die Genexpression, also nur die aus der mRNA hervorgegangene cDNA gemessen werden soll, müssen die Primer cDNA-spezifisch sein, das heißt sie dürfen nur die cDNA erfassen, nicht aber eventuell in der Probe vorhandene genomische DNA. Das wird erreicht, indem die Primer so gelegt werden, dass sie sich über eine Exon-Exon-Spleißstelle erstrecken („intron spanning primer“). Durch das fehlende Intron in der mRNA besitzt die cDNA an dieser Stelle eine andere Sequenz als die genomische DNA, so dass der entsprechend konstruierte Primer nur an die cDNA bindet. Eine weitere Möglichkeit, cDNA-spezifische Primer zu konstruieren ist, sie so zu legen, dass sie ein langes Intron (>1500 Basen) umfassen. Der Forward Primer bindet an das vor dem Intron liegende Exon, der Reverse Primer bindet an das nachfolgende, hinter dem Intron liegende Exon. Die Intronsequenz gibt es nur in der genomischen DNA, nicht in der cDNA, und sie ist so lang, dass während der 30sekündigen Elongationsphase der PCR die Polymerase nicht das nächste Exon erreicht, so dass der zweite Primer nicht binden kann und es zum Abbruch der Kettenreaktion kommt. Die Exon-Intron-Sequenz eines Gens kann im Internet auf der Homepage des European Bioinformatics Institute (EBI) und des Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), Hinxton, Cambridge, UK, <http://www.ensembl.org> abgerufen werden. Die Sequenz kann in das Textverarbeitungsprogramm „Word“ von Microsoft kopiert werden und anhand der Suchfunktion in „Word“ lässt sich dann überprüfen, wo genau die Primer binden. Dabei muss beachtet werden, dass die komplementäre Sequenz des Reverse Primer von rückwärts in die Suchmaske von „Word“ einzugeben ist.

Zur Konstruktion der Primer wird das Programm „Primer Express v2.0“ von Applied Biosystems verwendet. Die codierende Sequenz (ohne Introns) des zu erfassenden Gens wird in

das dafür vorgesehene Feld des Programms kopiert. Nach dem Befehl zur Primersuche wird eine Liste möglicher Primerpaare angezeigt, die einige vorgeschriebene Bedingungen erfüllen, wie zum Beispiel bestimmte Primerlänge (18-22 Basen), Schmelztemperatur bei ca. 60°C und nicht zu großer GC-Gehalt (ca. 50%), da sich die Doppelstränge sonst zu langsam voneinander lösen. Aus dem gleichen Grund soll die Länge des Amplicons (des gewünschten PCR-Produktes) 150 bp möglichst nicht überschreiten. Die optimale Länge sind etwa 100 bp. Die Primerpaare werden dann wie oben beschrieben auf ihre Spezifität hin untersucht. Mit der Synthese der Primer wird die Firma MWG Biotech AG, 85560 Ebersberg, Deutschland, beauftragt (<http://www.mwg-biotech.com>). Die Primer werden im HPSF-Verfahren (high purity salt free) synthetisiert und in lyophilisiertem Zustand geliefert. Nach Ankunft werden sie sofort in Ampuwa gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl (100 µM) eingestellt. Von dieser Stammlösung wird ein Aliquot gebrauchsfertige Lösung durch nochmalige Verdünnung mit Ampuwa auf 5 pmol/µl (5 µM) hergestellt.

3.3.6.2. Auswertung der Real Time PCR

Die Auswertung der Real Time PCR erfolgt mit dem Programm „ABI Prism 7000 SDS“ von Applied Biosystems. Es zeigt den Verlauf der PCR als Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Zeit und gibt die dazugehörigen c_T Werte an. Die weitere Analyse und graphische Darstellung des Ergebnisses wird durchgeführt mit dem Programm „GraphPad Prism v4.0“ von GraphPad Software. Zunächst werden alle c_T Werte in einer Tabelle im Programm eingetragen. Die Auswertung geschieht nach folgender Formel aus dem Handbuch von Applied Biosystems (ABI Prism 7700 Sequence Detection System. The Perkin Elmer Corporation. User Bulletin #2: Rev A, Part # 4303859, Stock # 777802-001 (1997)) auf der Homepage <http://www.appliedbiosystems.com> :

$$\text{Genexpression} = 2^{-(c_T \text{ Wert Gen} - c_T \text{ Wert Housekeeping-Gen})}$$

In „GraphPad Prism v4.0“ entspricht das dem Algorithmus $Y = 2^{-Y}$, nachdem man

$$Y = c_T \text{ Wert Gen} - c_T \text{ Wert Housekeeping-Gen}$$

vom Programm vorher hat berechnen lassen. Die c_T Werte der Doppelkontrollen werden gemittelt.

Der c_T Wert ist abhängig von der Anfangsmenge der zu detektierenden DNA. Je mehr von der zu detektierenden DNA zu Beginn der PCR in der Probe vorhanden ist, desto kleiner ist der c_T Wert. Deshalb geht $(c_T \text{ Wert Gen} - c_T \text{ Wert Housekeeping-Gen})$ als Kehrwert in die Formel ein. Die Menge der amplifizierten DNA verdoppelt sich in jeder PCR-Runde und steigt damit exponentiell an.

Das Ergebnis der Real Time PCR lässt sich vom Programm „GraphPad Prism v4.0“ in der gewünschten Form, zum Beispiel als Box & Whiskers-Plot, graphisch darstellen.

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen signifikant sind, wird der Mann-Whitney-Test (unpaired, two-tail) durchgeführt. Bei p-Werten $<0,05$ wird der Unterschied als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Immunhistochemische Untersuchung der Genexpression im Kolon-epithel: Proteinexpression der Anti-Apoptose-Gene Bcl-2 und Survivin und des Tumorsuppressorgens p53

4.1.1. Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2

Es werden insgesamt zehn Proben **normales Kolonepithel** von Menschen ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED) gefärbt. In 90% der untersuchten Gefrierschnitte ist Bcl-2 vorhanden (Abb. 4-1 bis 4-9), eine Probe zeigt keine Bcl-2-Färbung (Abb. 4-10). Bei den Bcl-2-positiven Proben ist die Bcl-2-Färbung im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen lokalisiert, wobei die Kryptenbasis am stärksten gefärbt ist (siehe Pfeile). Nicht alle Bcl-2-positiven Proben zeigen eine stark gefärbte Kryptenbasis, was aber höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Kryptenbasis beim Gefrierschneiden nicht getroffen worden ist. In allen Proben sind die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae (Basalmembran) stark Bcl-2-gefärbt (sie sind exemplarisch durch Pfeilköpfe gekennzeichnet).

Bcl-2-positive Proben (Abb. 4-1 bis Abb. 4-9):

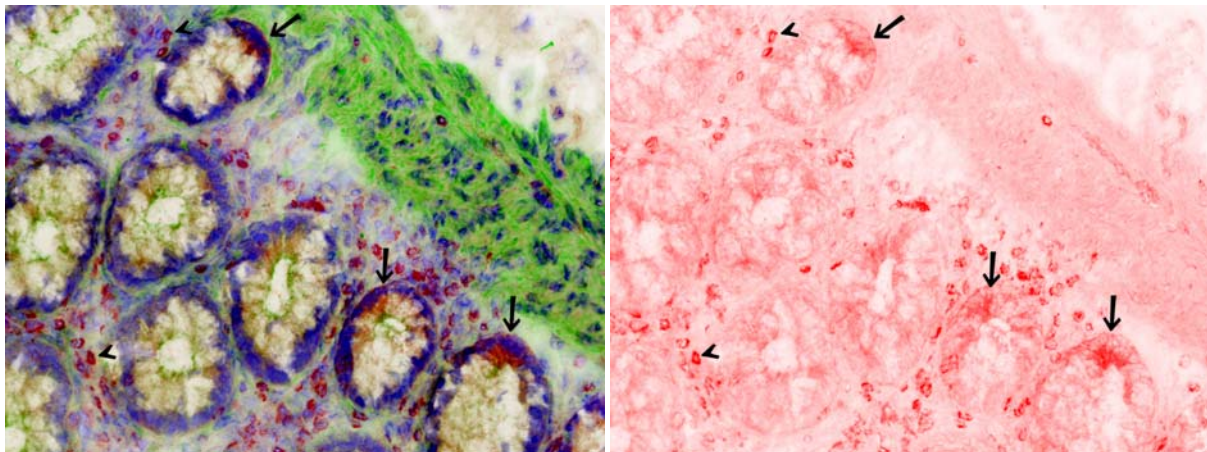


Abb. 4-1.a. Probe Nr. 4236 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

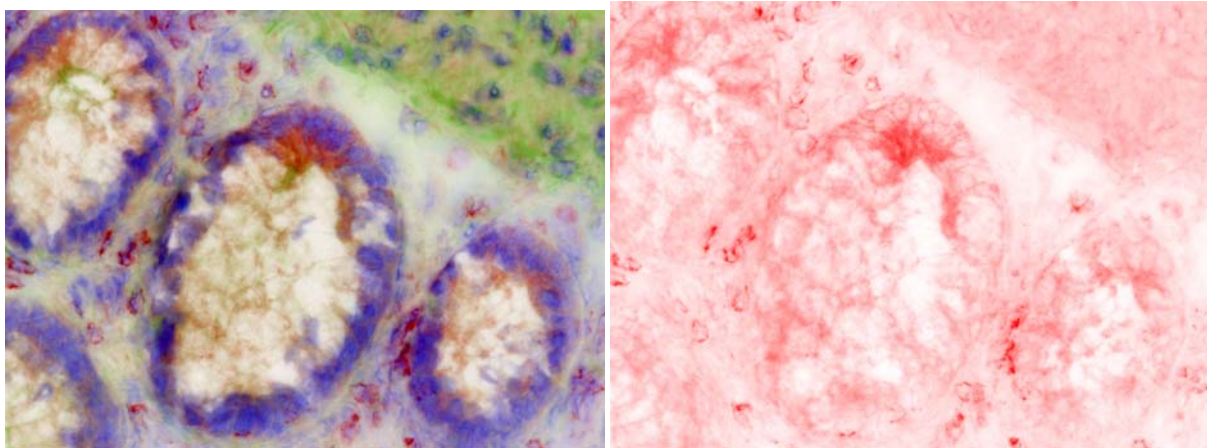


Abb. 4-1.b. Probe Nr. 4236 Normal. Originalvergrößerung 400 x. IF-Färbung von Bcl-2.

Abb. 4-1: Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe eines Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit Actin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Bcl-2-Färbung ist dargestellt. Es ist cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen vorhanden. Die Kryptenbasis ist am stärksten gefärbt (Pfeile). Die Lymphozyten zeigen ebenfalls starke Bcl-2-Färbung (Pfeilköpfe).

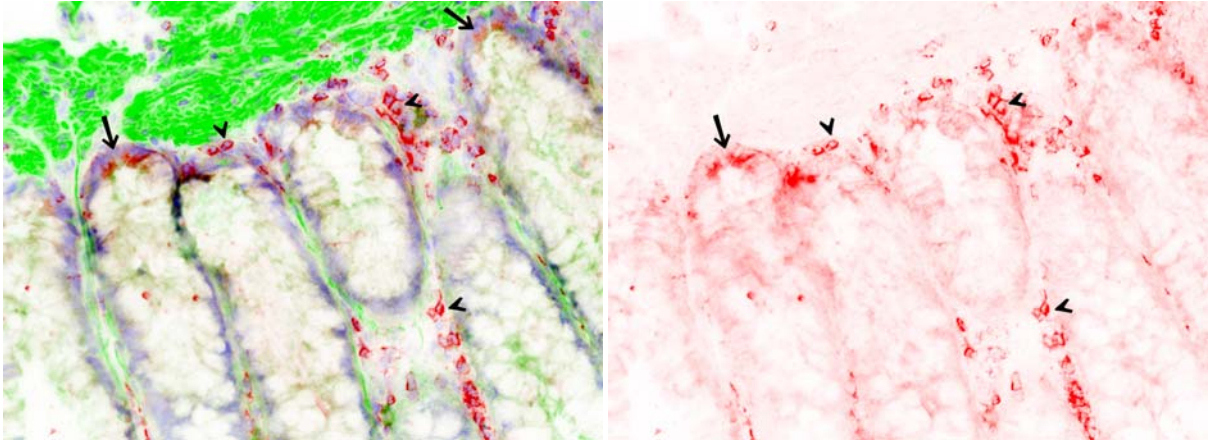


Abb. 4-2.a. Probe Nr. 10402 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

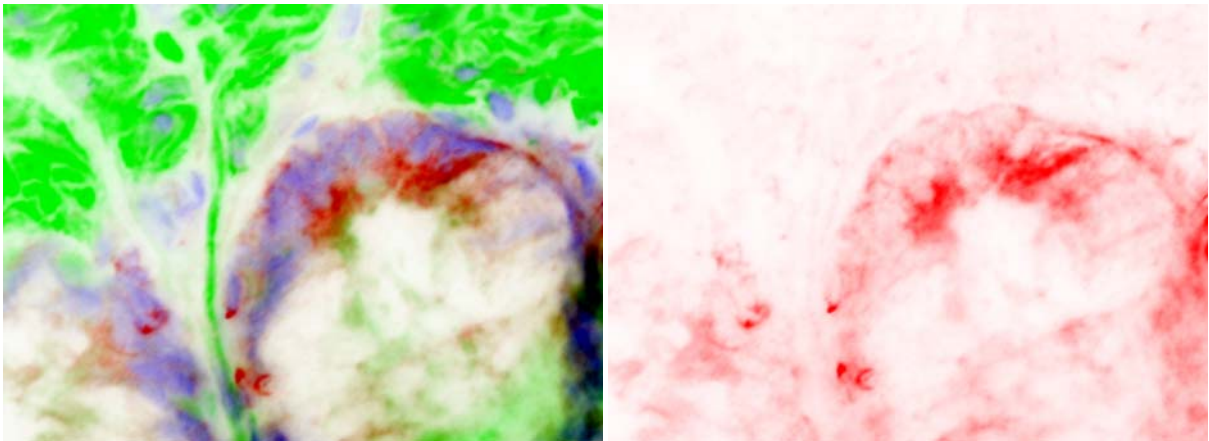


Abb. 4-2.b. Probe Nr. 10402 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-2.a. IF-Färbung von Bcl-2.

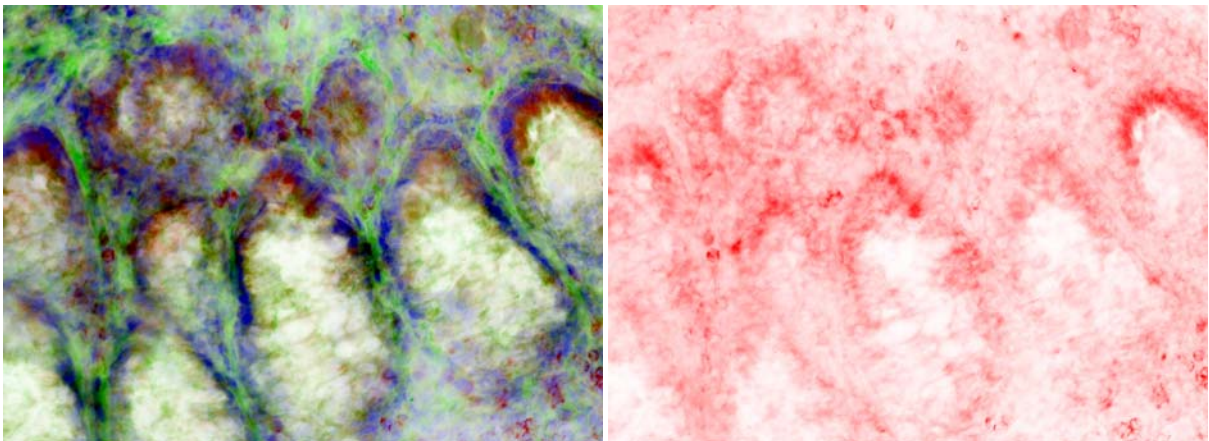


Abb. 4-3. Probe Nr. 3033 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

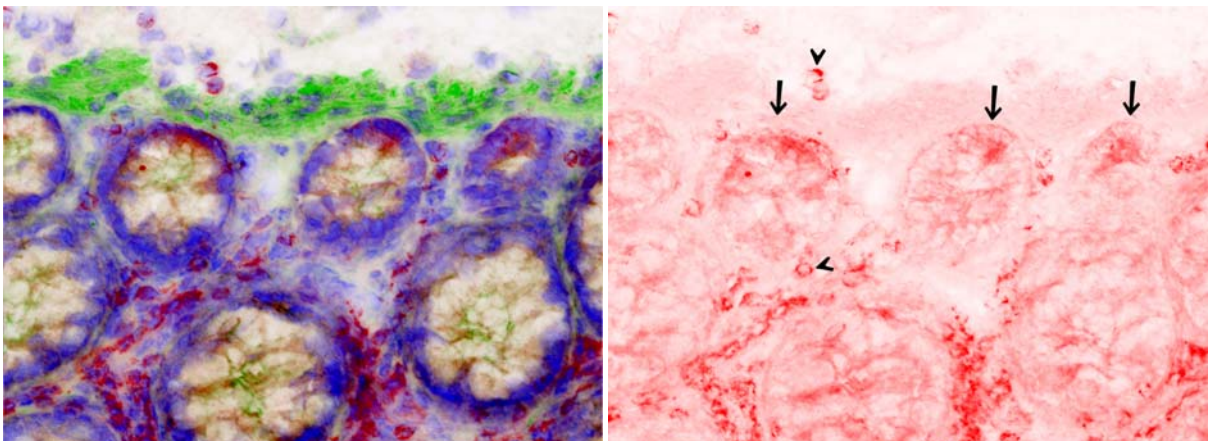


Abb. 4-4. Probe Nr. 4248 Normal. Originalvergrößerung 250 x. IF-Färbung von Bcl-2.

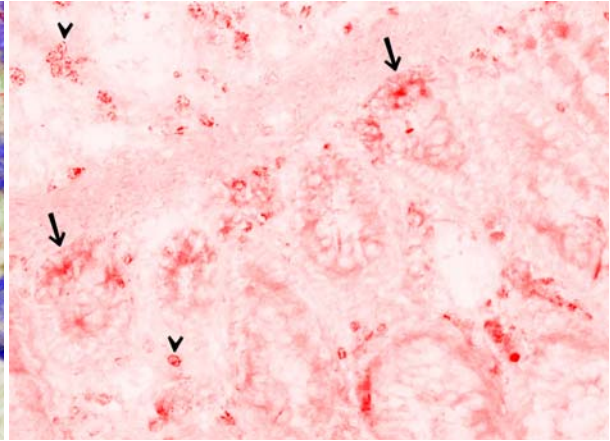
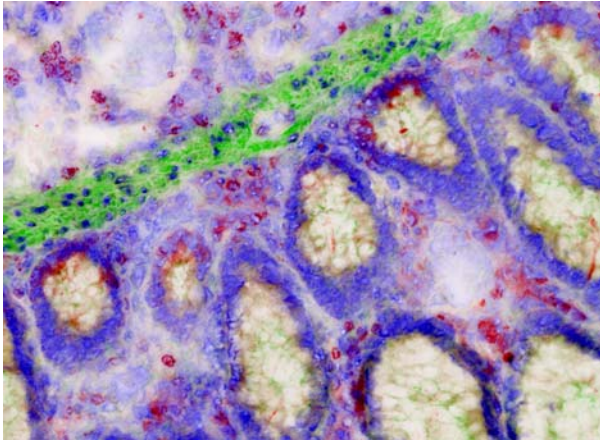


Abb. 4-5. Probe Nr. 4346 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

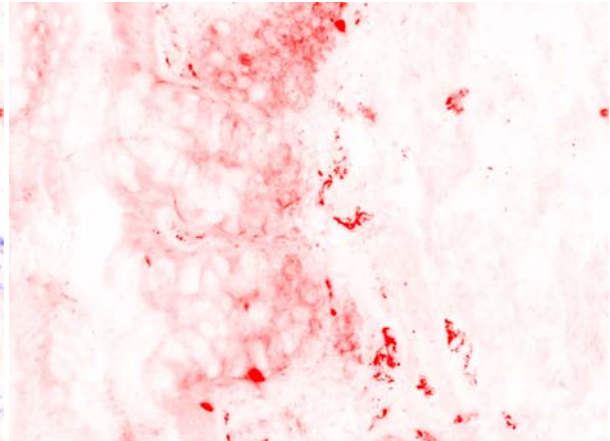
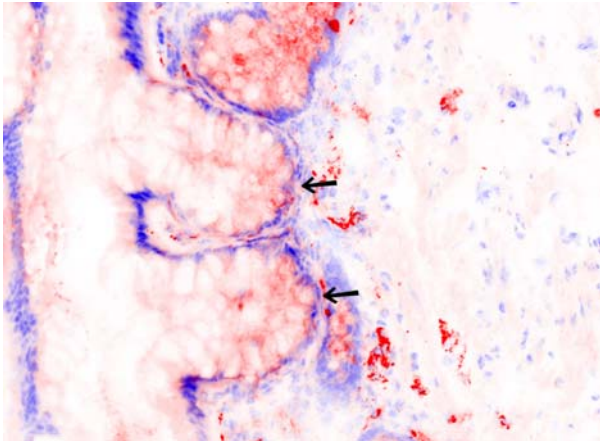


Abb. 4-6. Probe Nr. 326 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

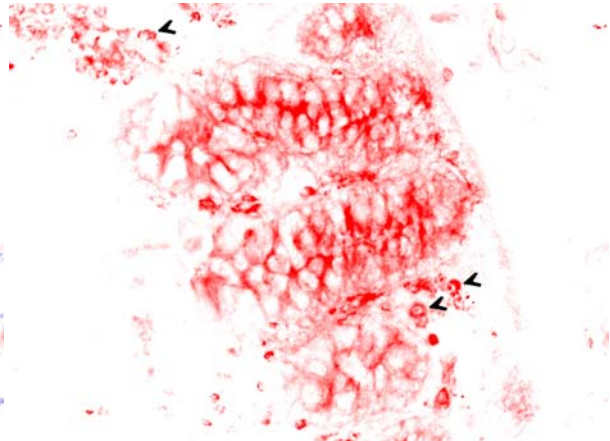
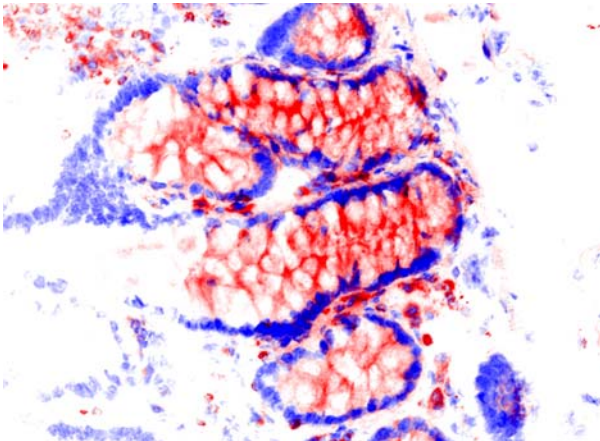


Abb.4-7. Probe Nr. 4830 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

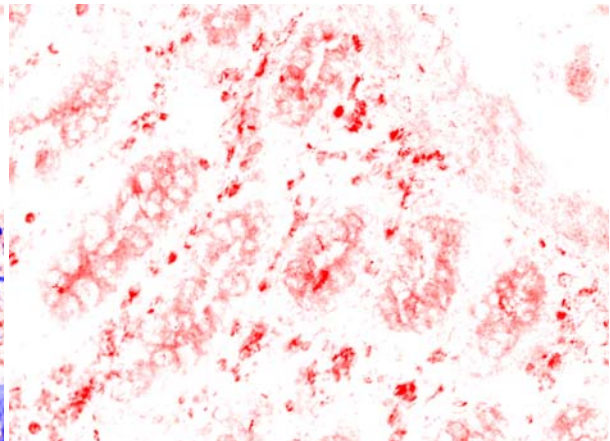
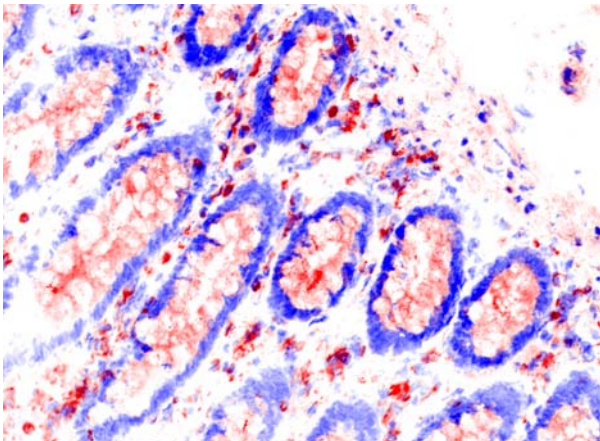


Abb. 4-8. Probe Nr. 2842 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

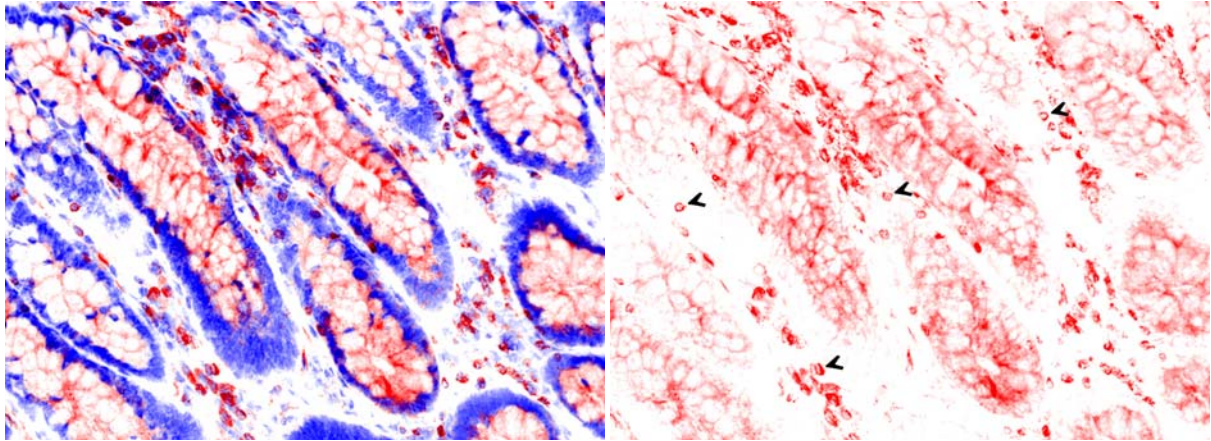


Abb. 4-9. Probe Nr. 4232 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

Bcl-2-negative Probe (Abb. 4-10):

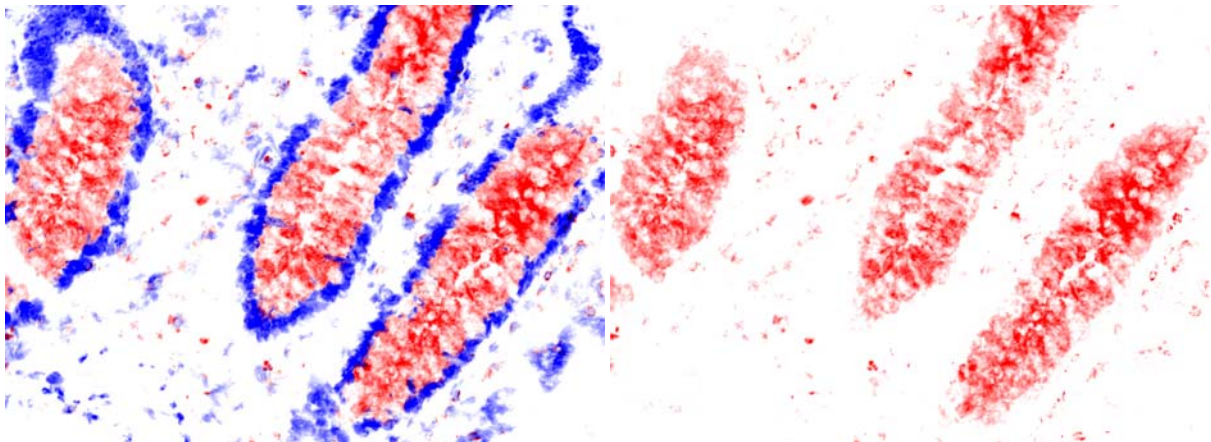


Abb. 4-10.a. Probe Nr. 4163 Normal. Originalvergrößerung 200 x.

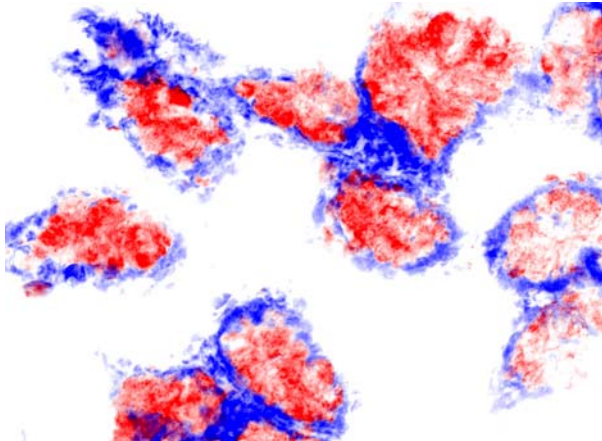


Abb. 4-10.b. Probe Nr. 4163 Normal. Negativkontrolle. Originalvergrößerung 200 x.

Abb. 4-1 bis 4-10:

Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Bcl-2-Färbung ist im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen vorhanden und ist in der Kryptenbasis am stärksten (siehe Pfeile). Die Basis der Krypten grenzt an die Lamina muscularis mucosae. Durch den hohen Actingehalt der Lamina muscularis mucosae ist diese grün gefärbt. Die Lymphozyten in der Lamina propria (Basalmembran) zeigen in allen Proben starke Bcl-2-Färbung (siehe Pfeilköpfe).

Abb.4-1 bis 4-5, links: Doppelfärbung mit Actin (grün).

Abb. 4-1 bis 4-9, rechts: Nur Bcl-2- Färbung ist dargestellt.

Abb. 4-10: Keine Bcl-2-Färbung. Beim vorhandenen Signal handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an den Schleim der Becherzellen. Die Negativkontrolle (Abb. 4-10.b) zeigt dasselbe Färbemuster wie die Probe (Abb. 4-10.a).

Bei den 20 gefärbten **Kolonepithelproben von Patienten mit Colitis Ulcerosa (CU)** ist der Anteil an Bcl-2-negativen Proben höher als bei der Gruppe der Normalproben. Er beträgt 25% (Abb. 4-26 bis 4-30). 75% der CED-Proben sind Bcl-2-positiv (Abb. 4-11 bis 4-25). Unter den 20 untersuchten CU-Proben befinden sich fünf Pseudopolyp- und zwei Polypproben. Sie verhalten sich bezüglich der Bcl-2-Färbung wie die anderen Proben. Die Pseudopolypproben sind Bcl-2-positiv; von den Polypproben ist eine Probe Bcl-2-positiv (Abb. 4-14), die andere Bcl-2-negativ (Abb. 4-30). Wie beim Normalgewebe ist auch hier bei den Bcl-2-positiven Proben das Bcl-2 im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen lokalisiert. Die Kryptenbasis ist am stärksten Bcl-2-gefärbt (Abb. 4-11 und 4-13). Die Lymphozyten zeigen in allen Proben eine starke Bcl-2-Färbung.

Bcl-2-positive Proben (Abb. 4-11 bis Abb. 4-25):

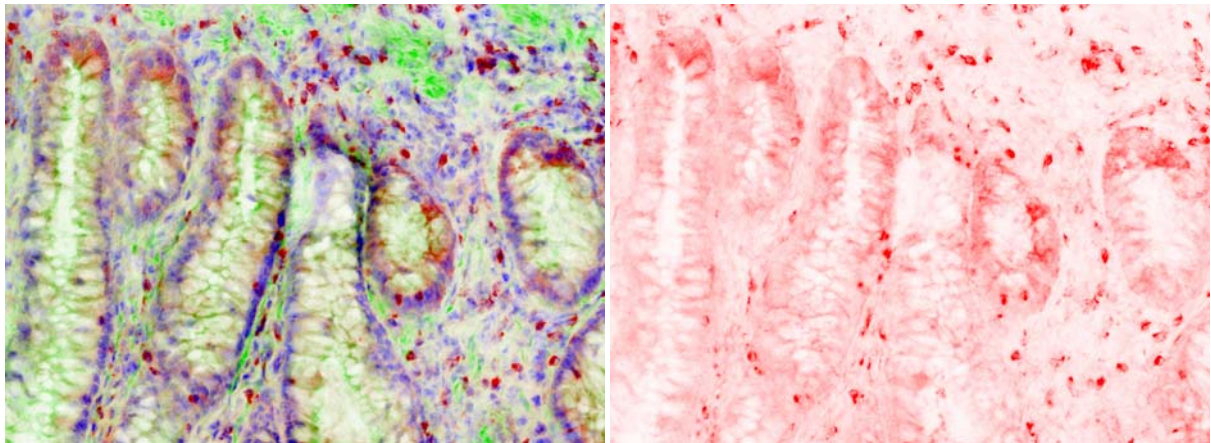


Abb. 4-11.a. Probe Nr. 527 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

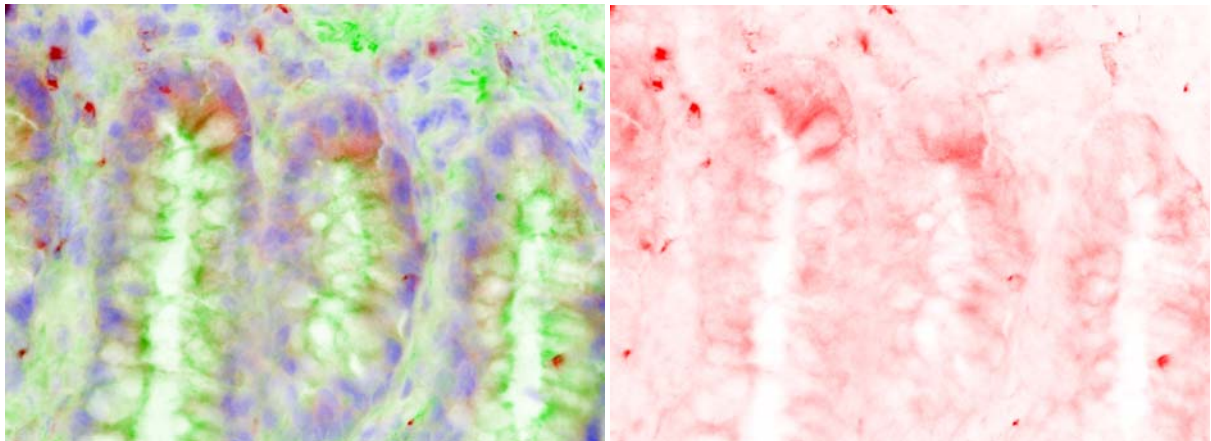


Abb. 4-11.b. Probe Nr. 527 CU. Originalvergrößerung 400 x. IF-Färbung von Bcl-2.

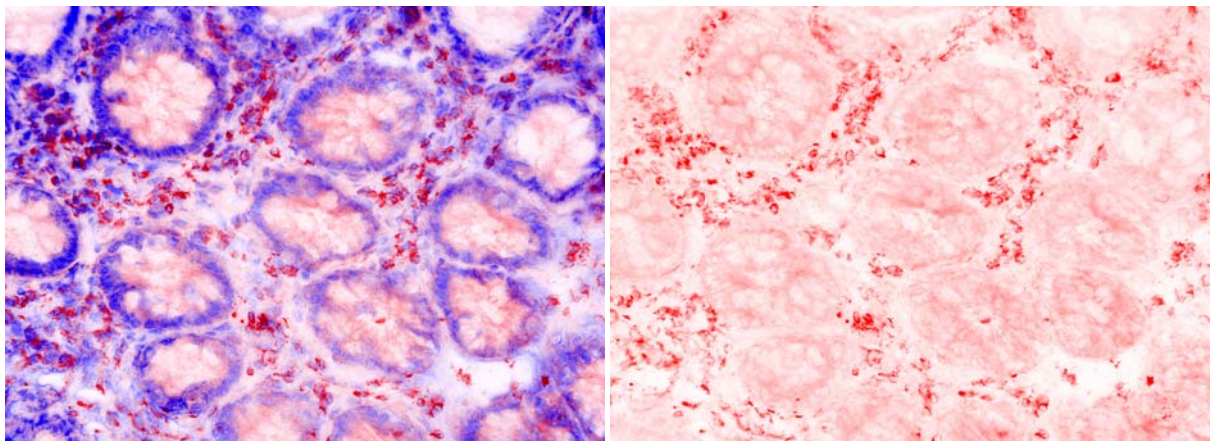


Abb. 4-12. Probe Nr. 610 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

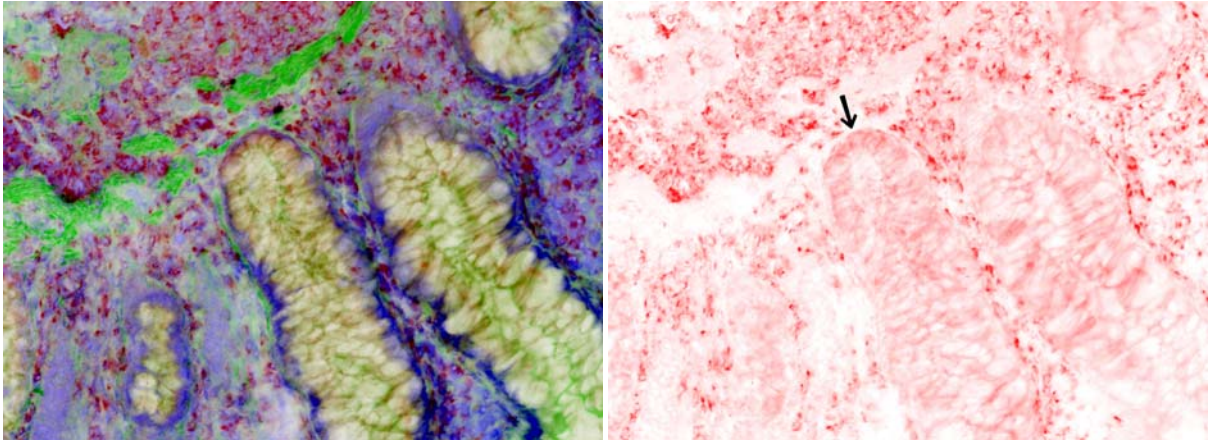


Abb. 4-13.a. Probe Nr. 608 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

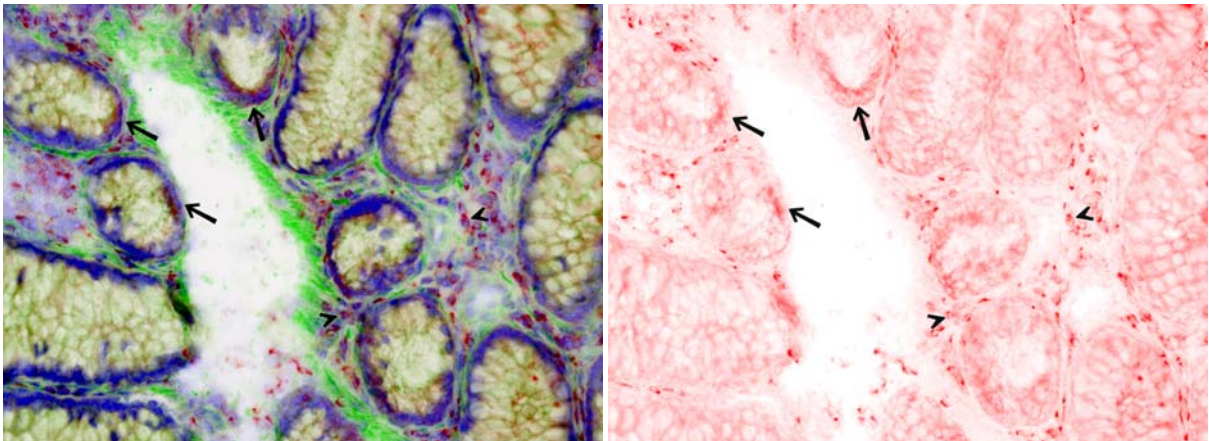


Abb. 4-13.b. Probe Nr. 608 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

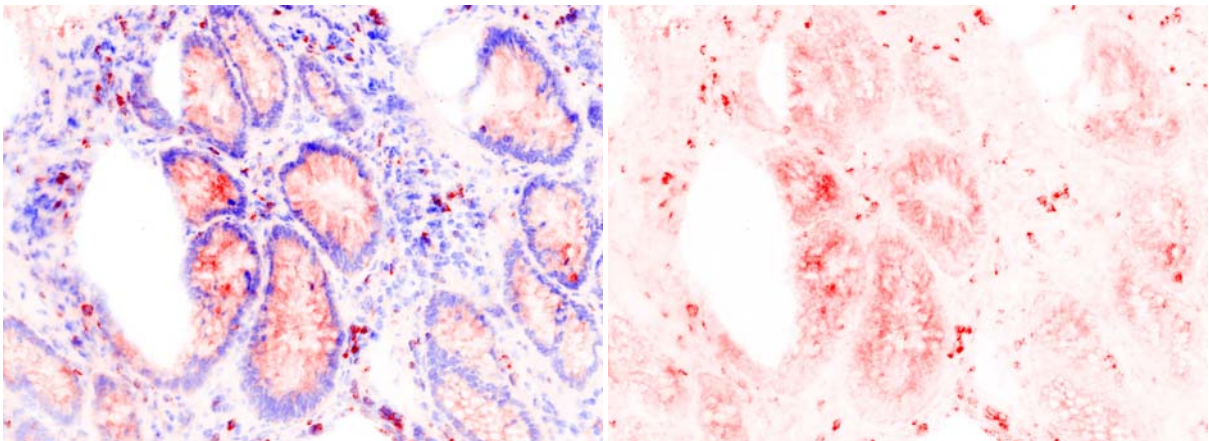


Abb. 4-14. Probe Nr. 523 CU, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

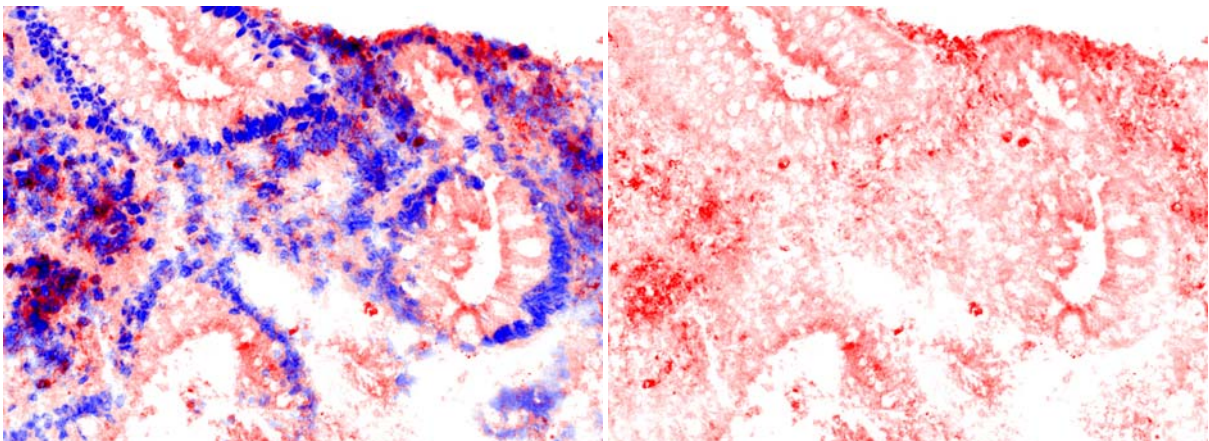


Abb. 4-15. Probe Nr. 524 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

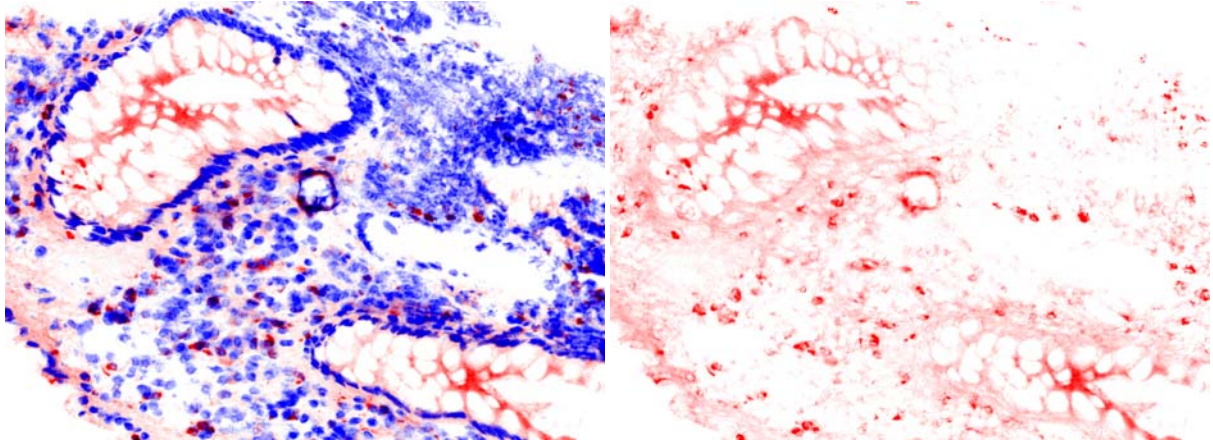


Abb. 4-16.a. Probe Nr. 586 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

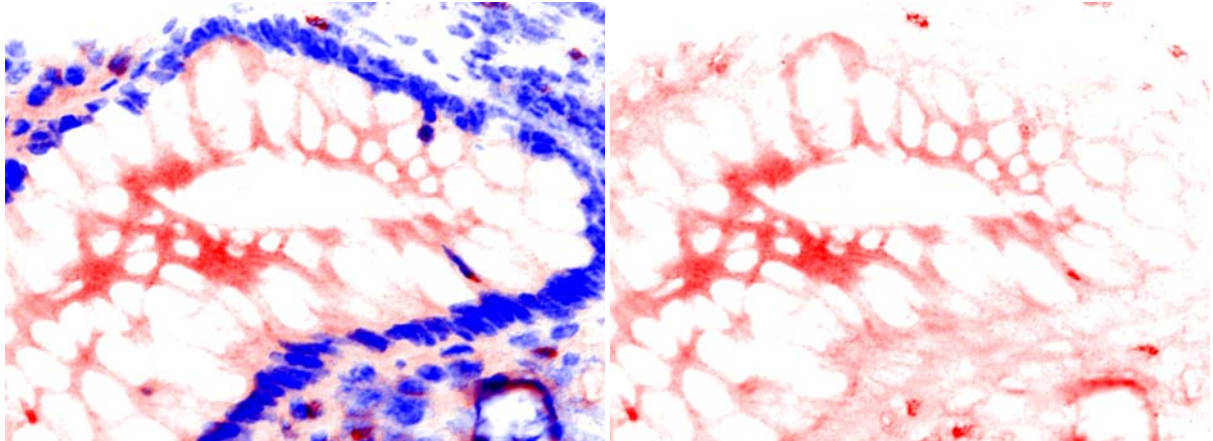


Abb. 4-16.b. Probe Nr. 586 CU, Pseudopolyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-16.a. IF-Färbung von Bcl-2.

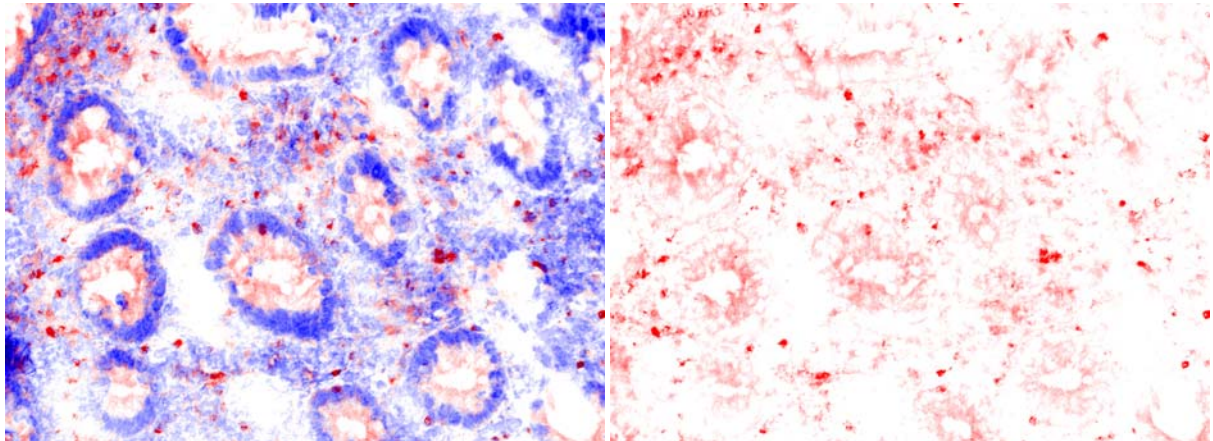


Abb. 4-17. Probe Nr. 571 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

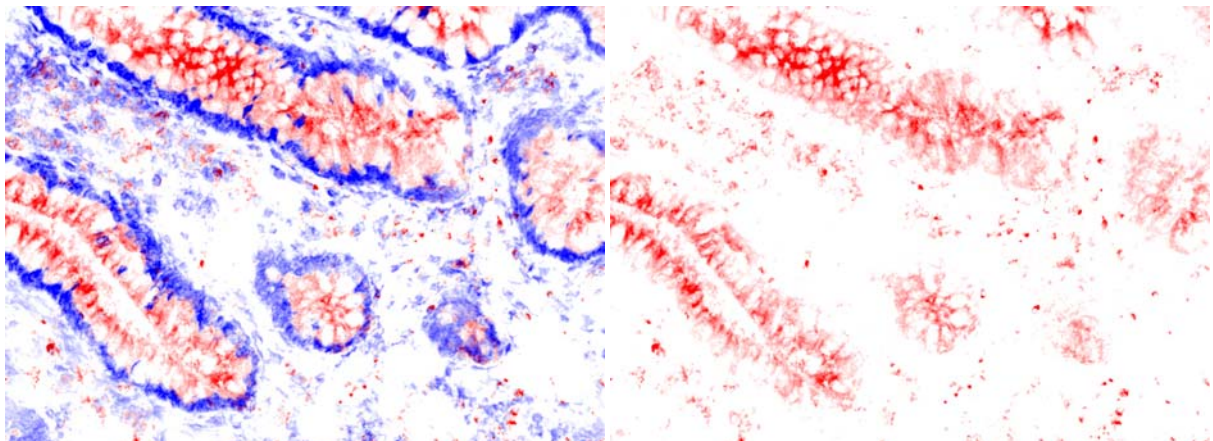


Abb. 4-18. Probe Nr. 474 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

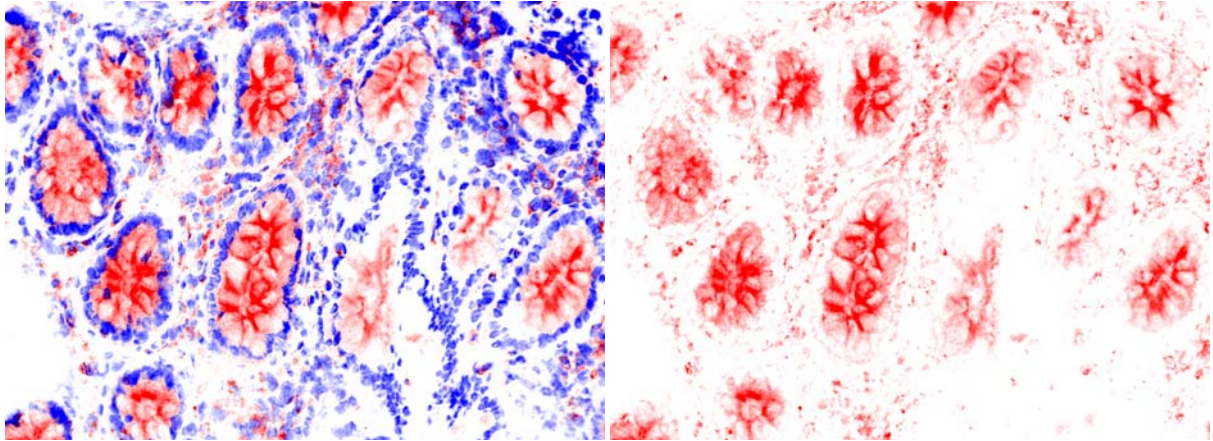


Abb. 4-19. Probe Nr. 475 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

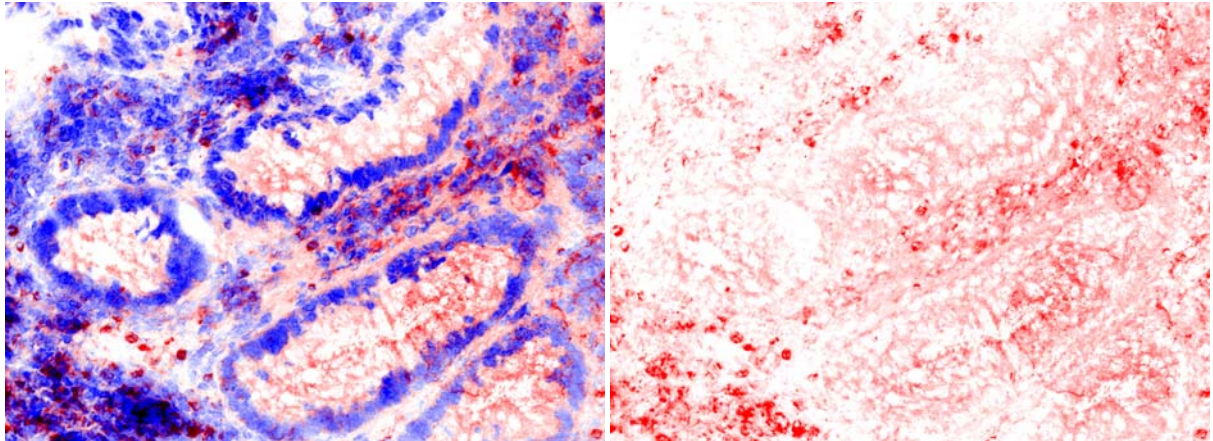


Abb. 4-20. Probe Nr. 595 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

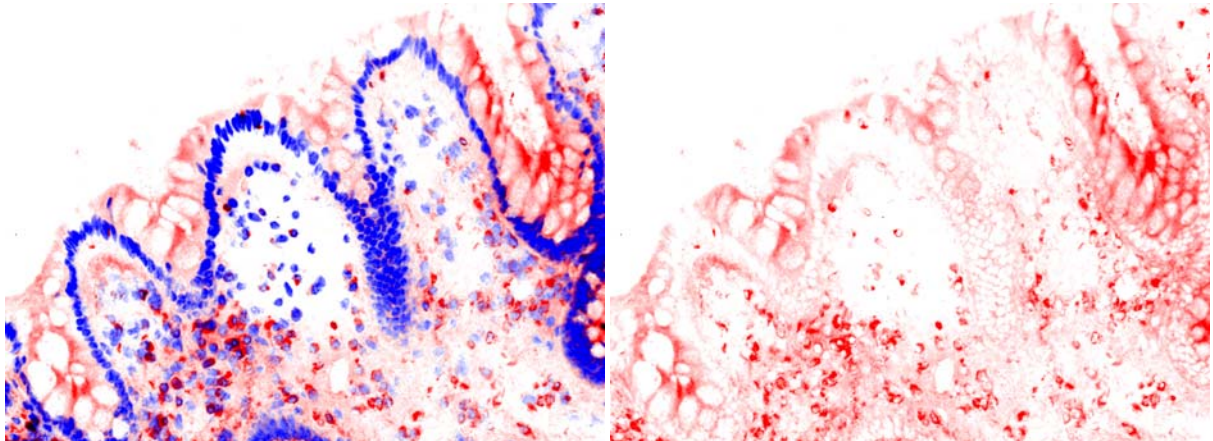


Abb. 4-21. Probe Nr. 584 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

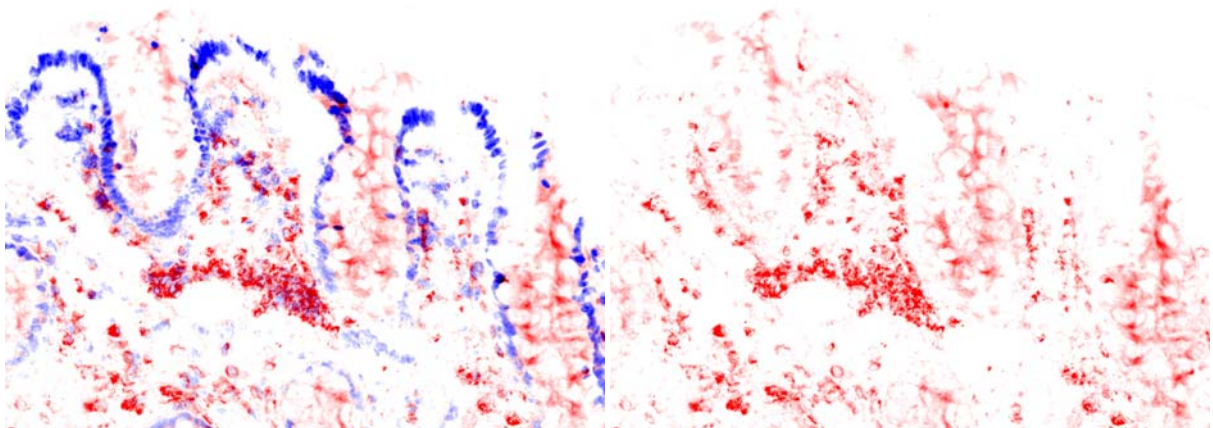


Abb. 4-22. Probe Nr. 536 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

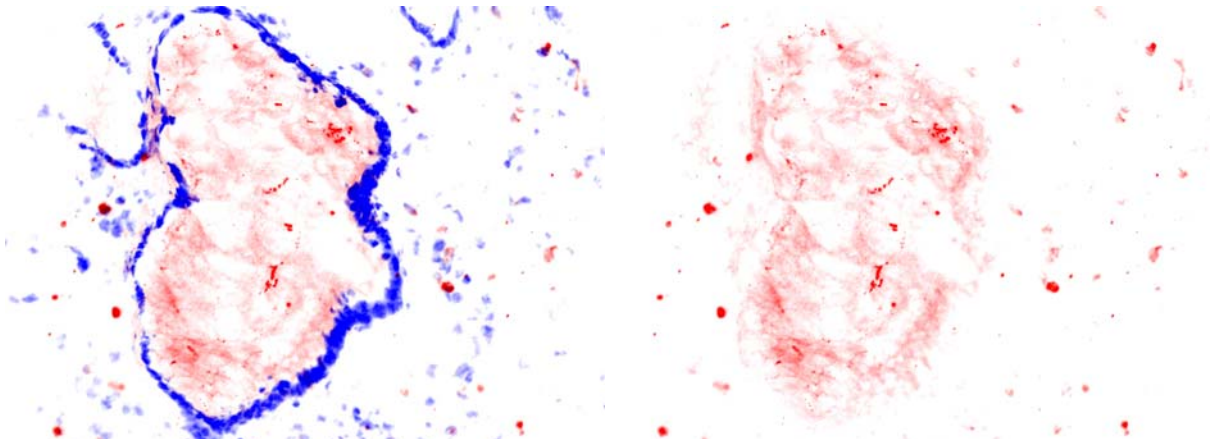


Abb. 4-23. Probe Nr. 544 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

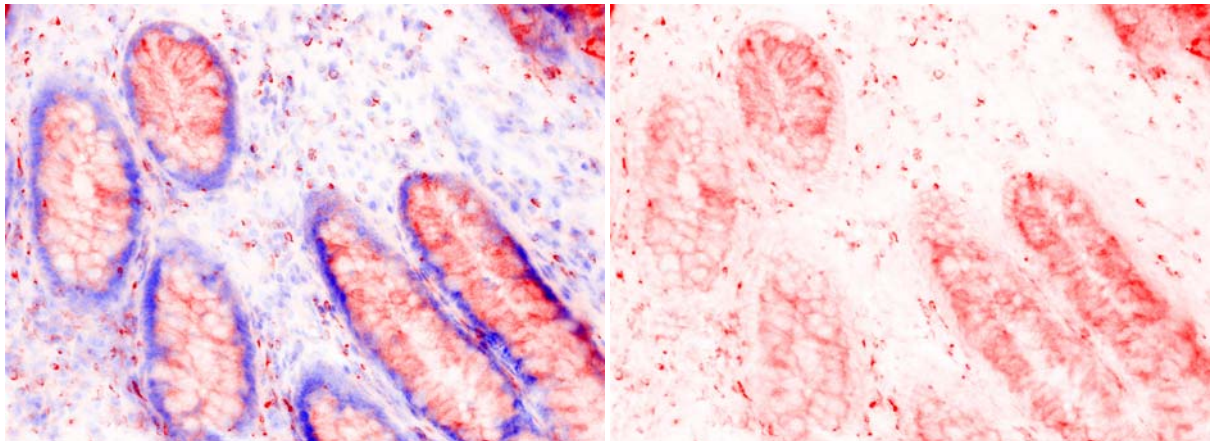


Abb. 4-24.a. Probe Nr. 577 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

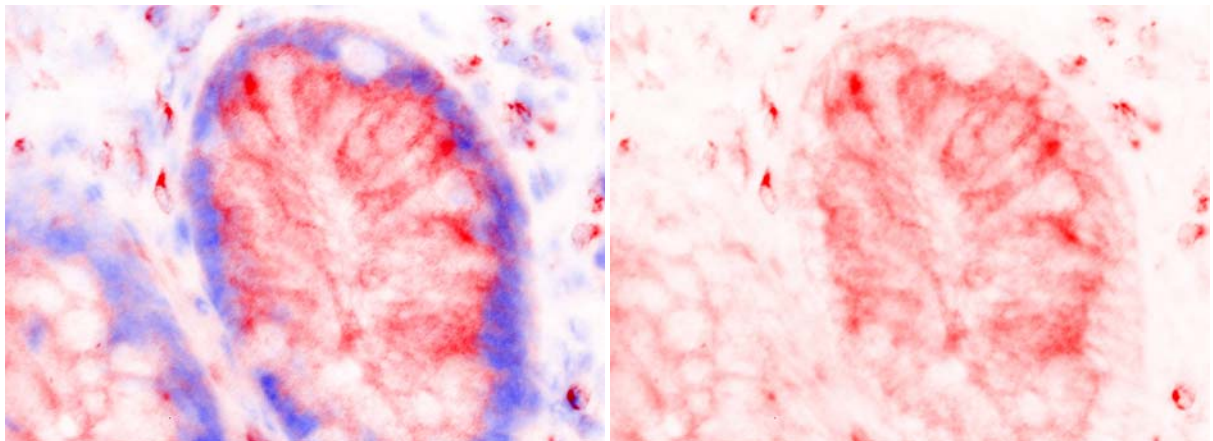


Abb. 4-24.b. Probe Nr. 577 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-24.a. IF-Färbung von Bcl-2.

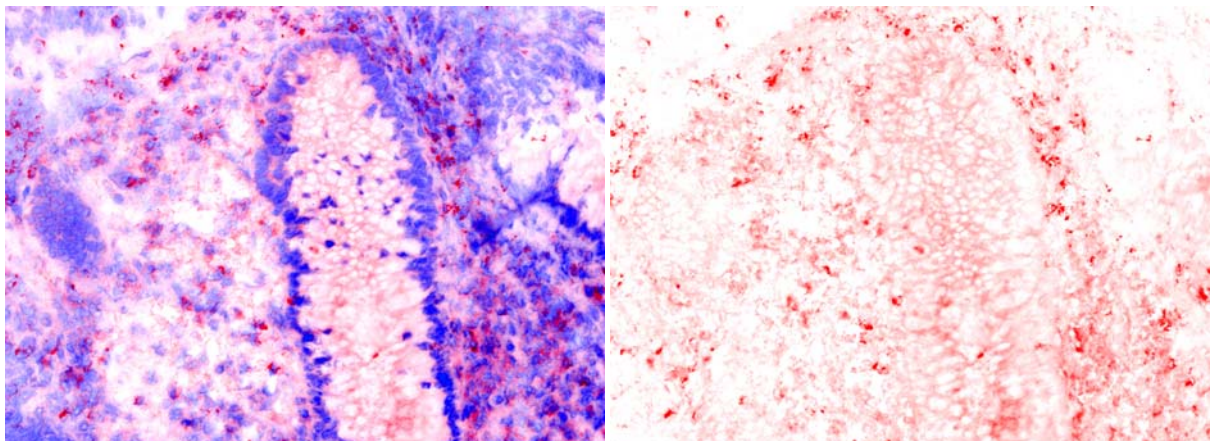


Abb. 4-25. Probe Nr. 552 CED (CU oder MC). Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

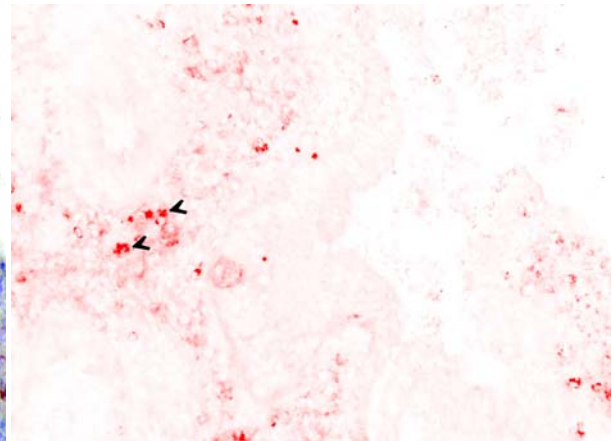
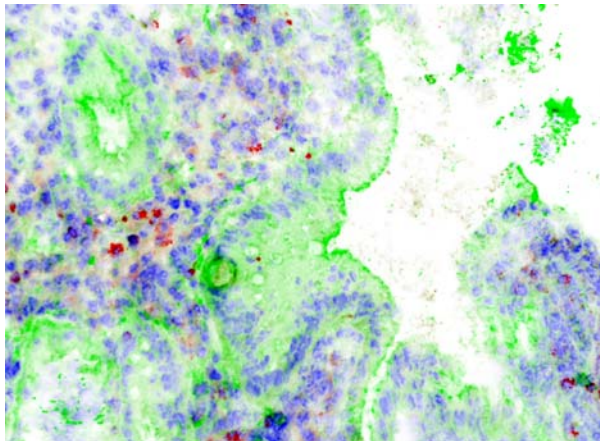
Bcl-2-negative Proben (Abb. 4-26 bis Abb. 4-30):

Abb. 4-26. Probe Nr. 522 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

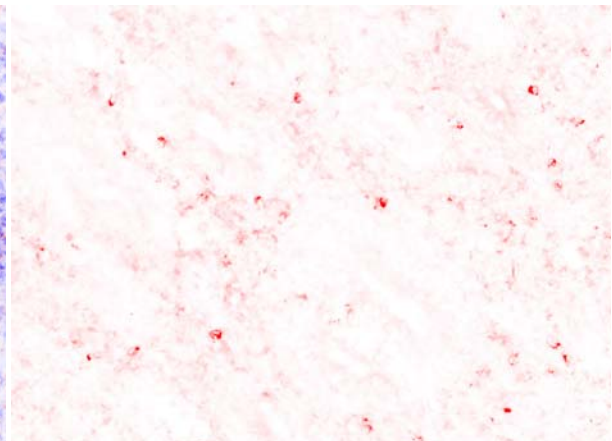
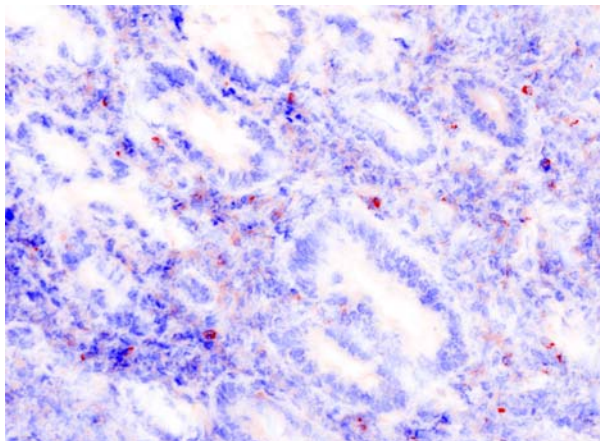


Abb. 4-27. Probe Nr. 562 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

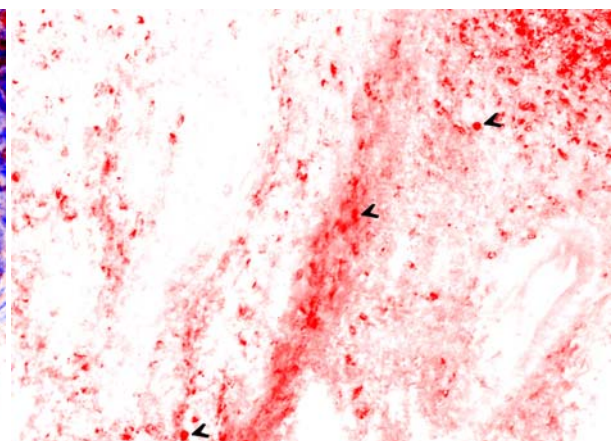
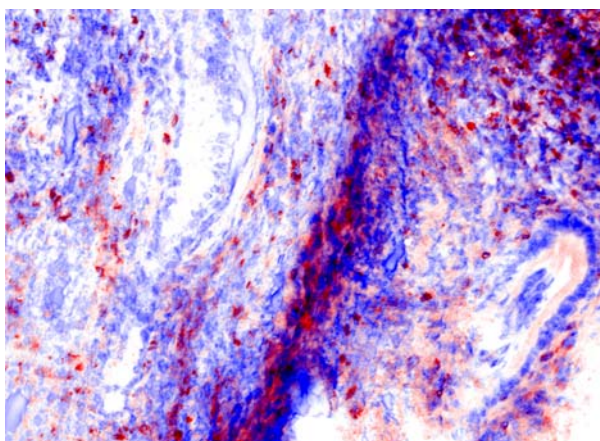


Abb. 4-28. Probe Nr. 574 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

Abb. 4-26 bis 4-28: Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel, Gewebe von CU-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. 4-26, links: Doppelfärbung mit Actin (grün).

Es ist keine Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen vorhanden. Die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae zeigen starke Bcl-2-Färbung (Pfeilköpfe).

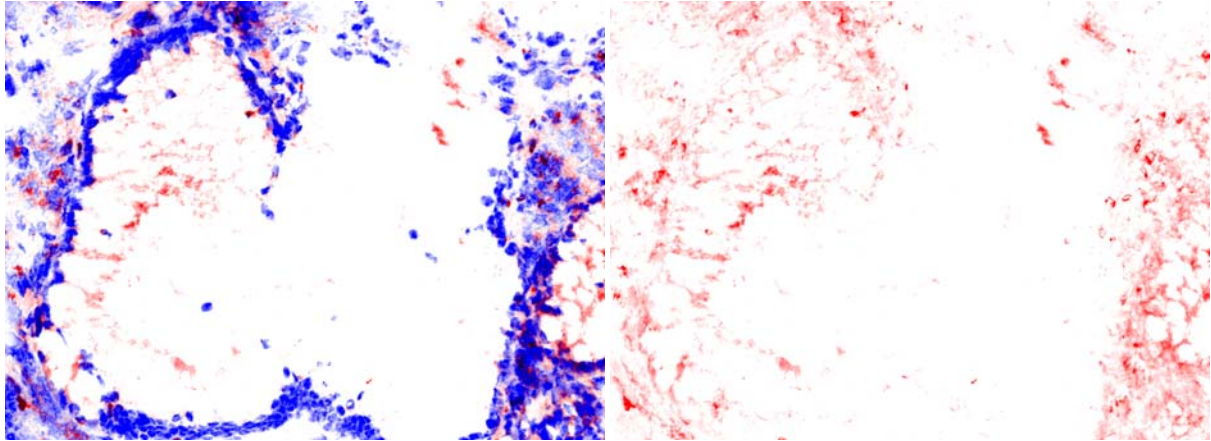


Abb. 4-29. Probe Nr. 566 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

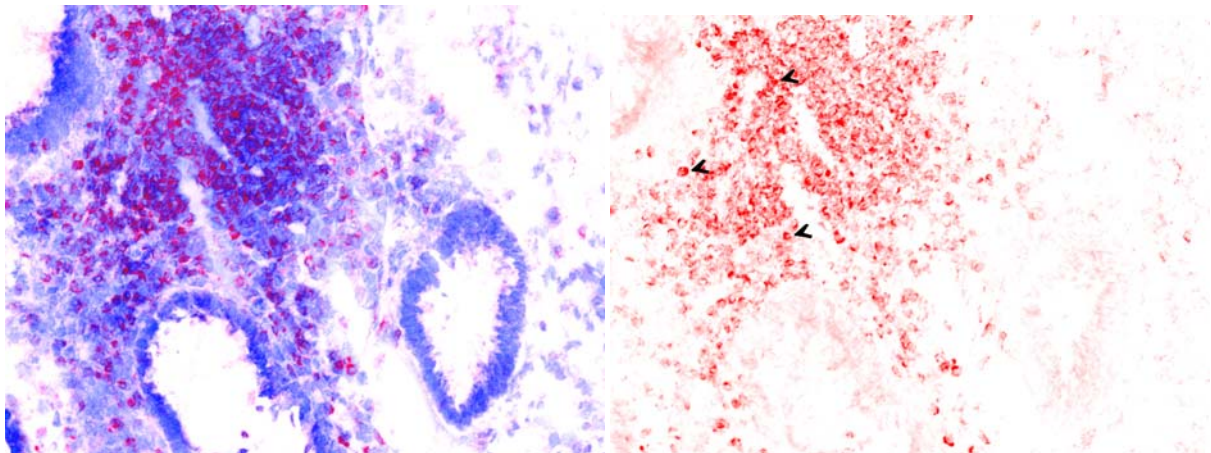


Abb. 4-30. Probe Nr. 583 CU, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

Abb. 4-11 bis 4-30:

Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel, Gewebe von CED-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb.4-11 bis 4-25: Die Proben sind Bcl-2-positiv. Sie zeigen cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen.

Abb. 4-26 bis 4-30: Die Proben sind Bcl-2-negativ in den Kryptenepithelzellen. Die Lymphozyten in der Lamina propria sind stark Bcl-2-gefärbt.

Abb. 4-11, Abb. 4-13 und Abb. 4-26, links: Doppelfärbung mit Actin (grün).

Abb. 4-11 bis 4-30, rechts: Nur Bcl-2- Färbung ist dargestellt.

Die Bcl-2-Färbung bei den positiven Proben ist in der Kryptenbasis (Stammzellbereich) am stärksten (siehe Pfeile). Die Basis der Krypten grenzt an die Lamina muscularis mucosae. Durch den hohen Actingehalt der Lamina muscularis mucosae ist diese grün gefärbt. Die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae (Basalmembran) zeigen in allen Proben starke Bcl-2-Färbung (siehe Pfeilköpfe).

Von den zehn untersuchten **Polypproben** sind 90% Bcl-2-positiv und zeigen wie die anderen positiven Proben eine cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen (Abb. 4-31 bis 4-39). Nur eine Probe ist in den Krypten Bcl-2-negativ (Abb. 4-40). In allen Proben sind die Lymphozyten stark Bcl-2-gefärbt. Die Polypproben stammen von Menschen ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung.

Bcl-2-positive Proben (Abb. 4-31 bis Abb. 4-39):

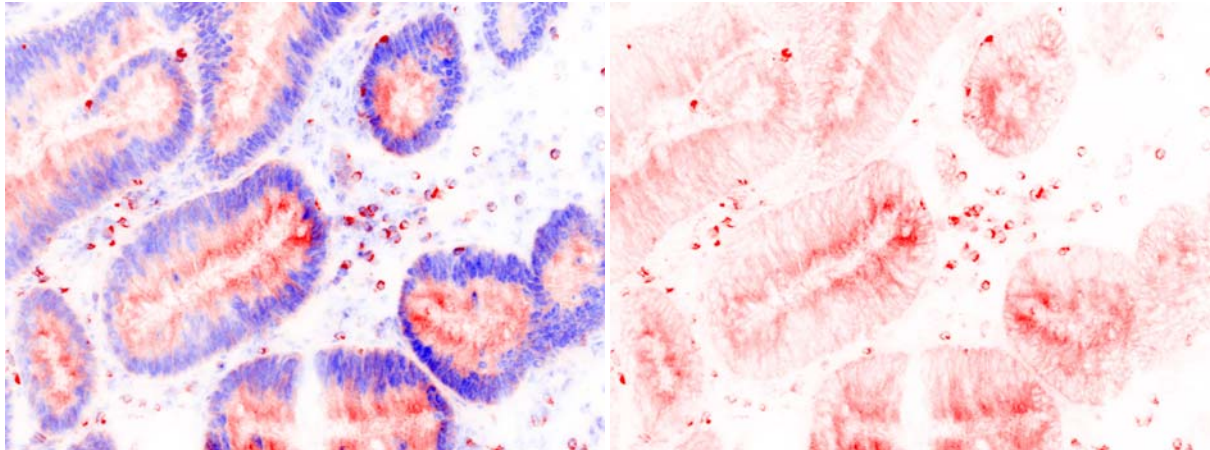


Abb. 4-31.a. Probe Nr. 521 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

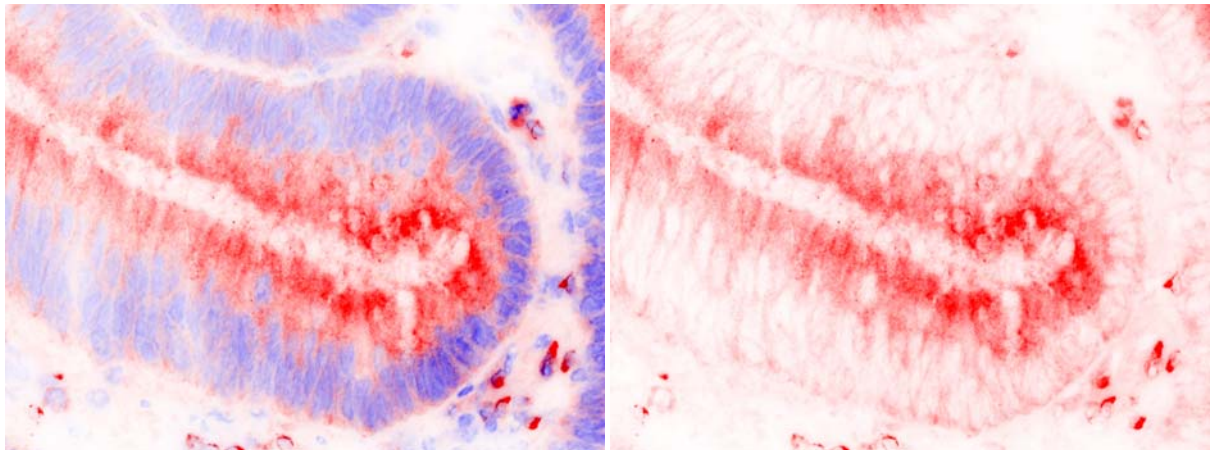


Abb. 4-31.b. Probe Nr. 521 Polyp. Originalvergrößerung 400 x. IF-Färbung von Bcl-2.

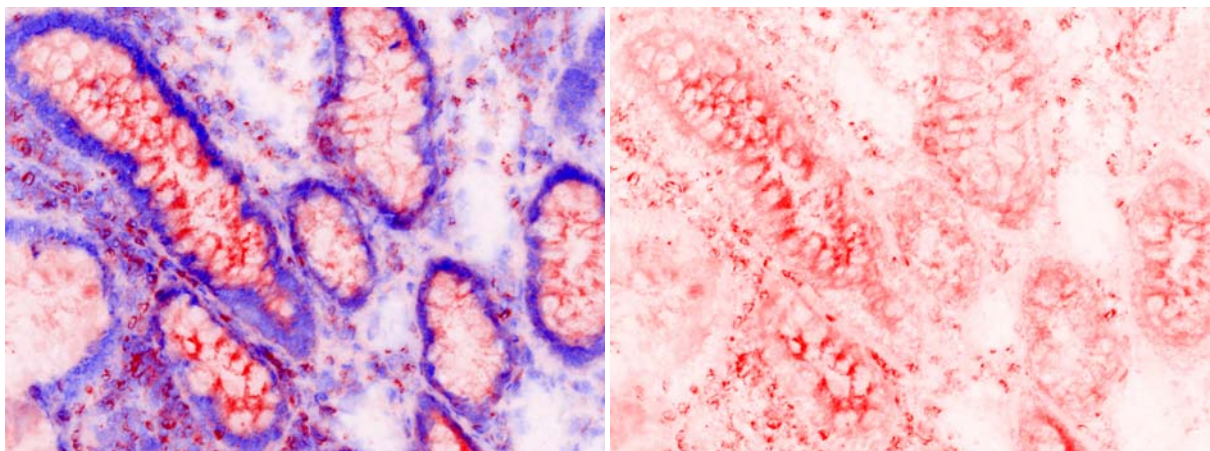


Abb. 4-32. Probe Nr. 613 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

Abb. 4-31 bis 4-32: Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel, Polyppgewebe von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt. Abb. rechts: Nur Bcl-2-Färbung ist dargestellt. Es ist cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen vorhanden. Die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae sind stark Bcl-2-gefärbt.

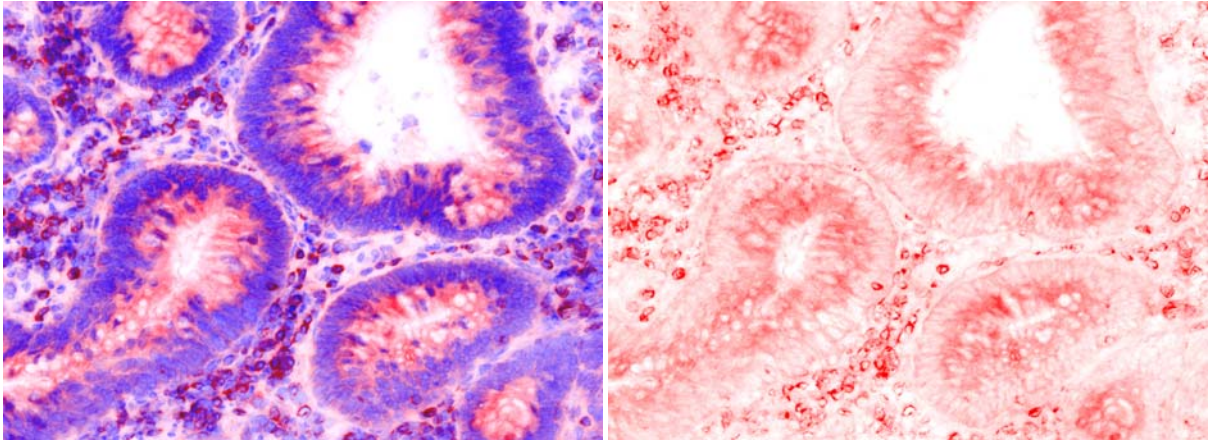


Abb. 4-33. Probe Nr. 603 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

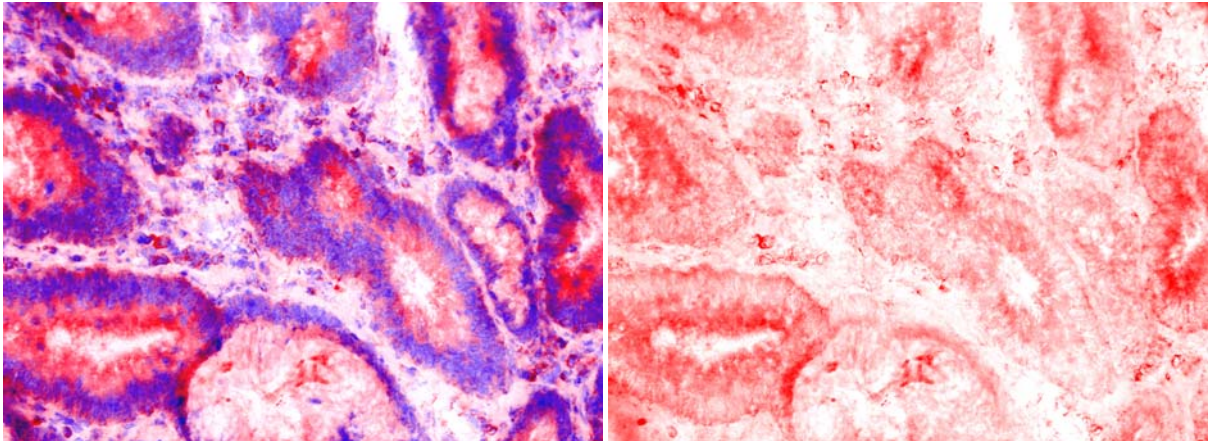


Abb. 4-34. Probe Nr. 615 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

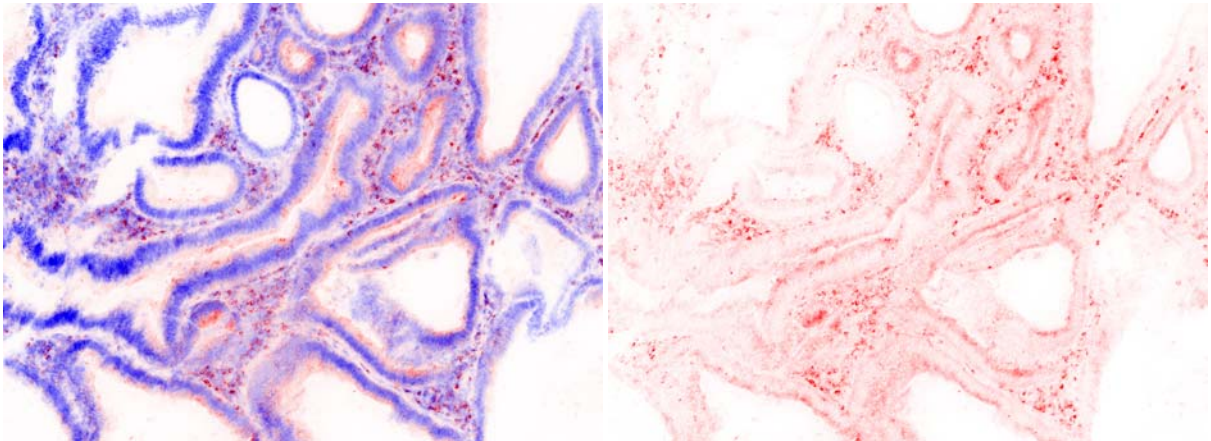


Abb. 4-35.a. Probe Nr. 568 Polyp. Originalvergrößerung 100 x. IF-Färbung von Bcl-2.

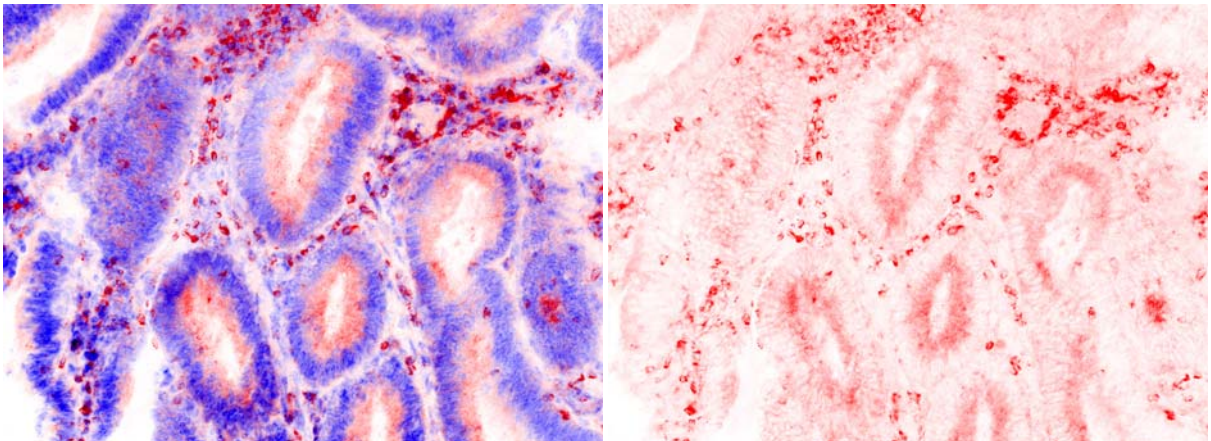


Abb. 4-35.b. Probe Nr. 568 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

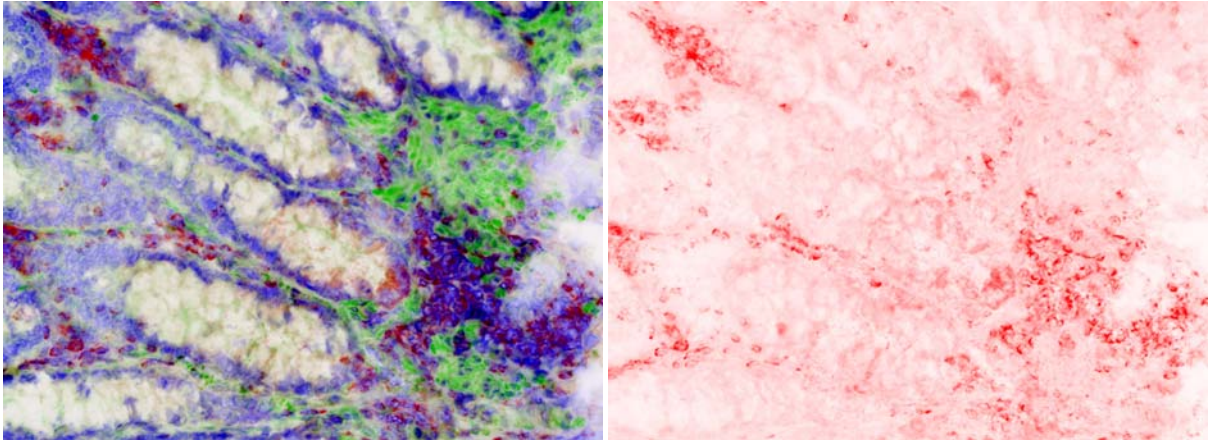


Abb. 4-36.a. Probe Nr. 618 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

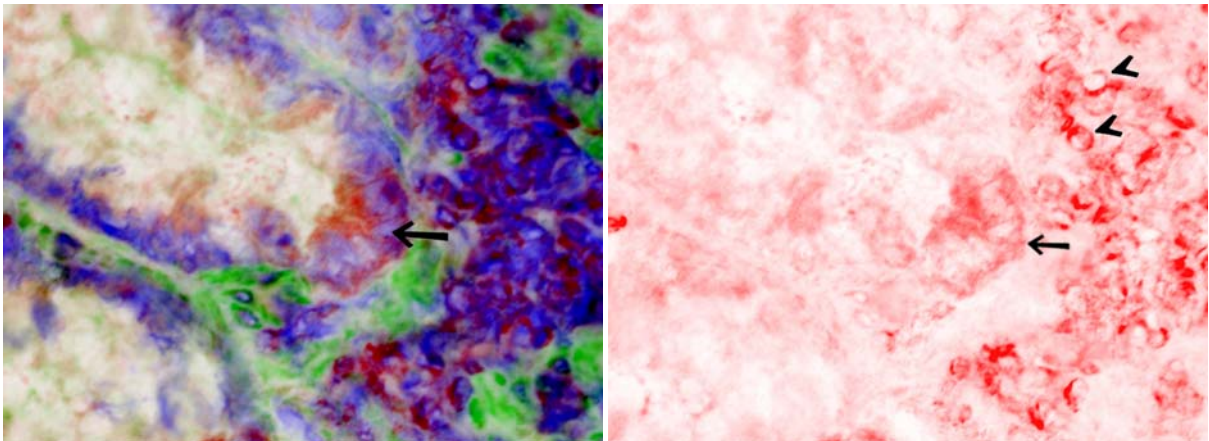


Abb. 4-36.b. Probe Nr. 618 Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-36.a. IF-Färbung von Bcl-2.

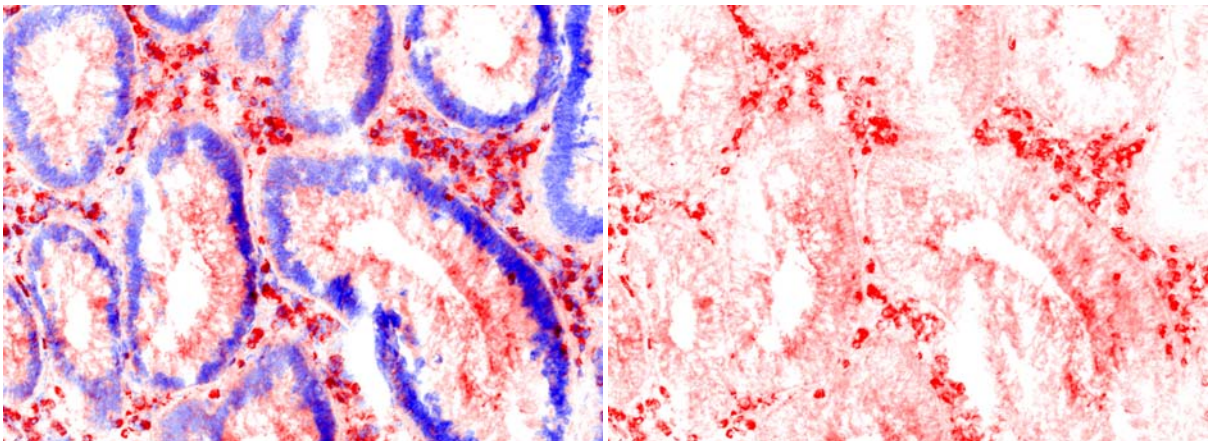


Abb. 4-37. Probe Nr. 553 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

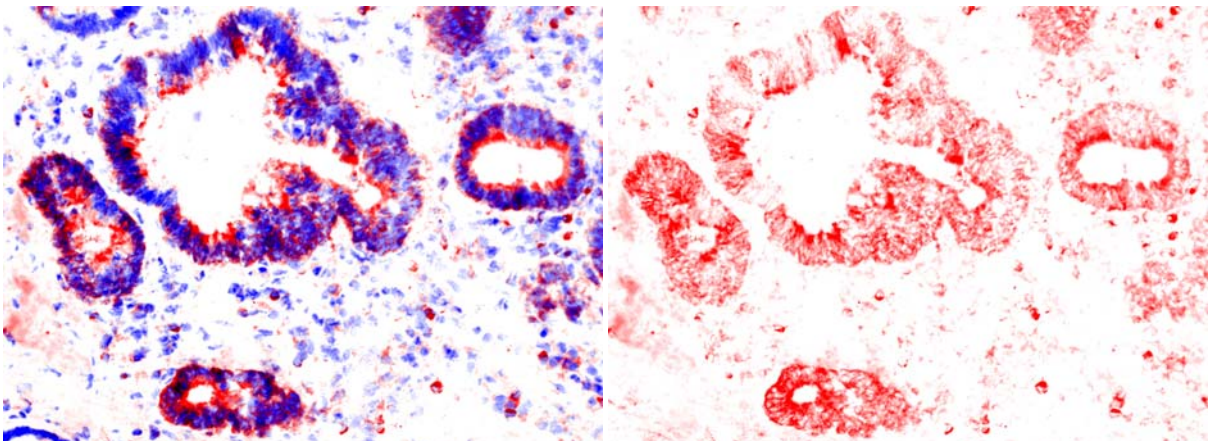


Abb. 4-38. Probe Nr. 545 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

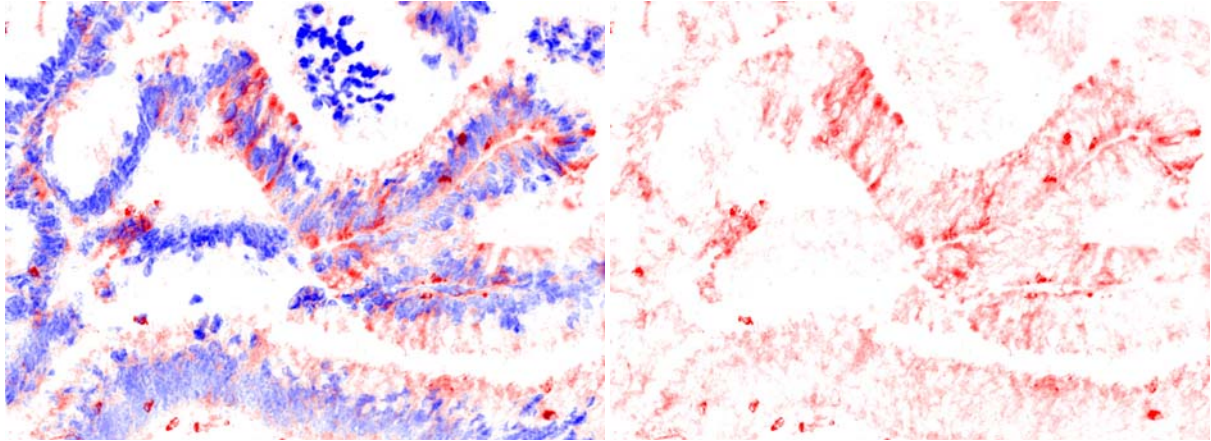


Abb. 4-39. Probe Nr. 598 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

Bcl-2-negative Probe (Abb. 4-40):

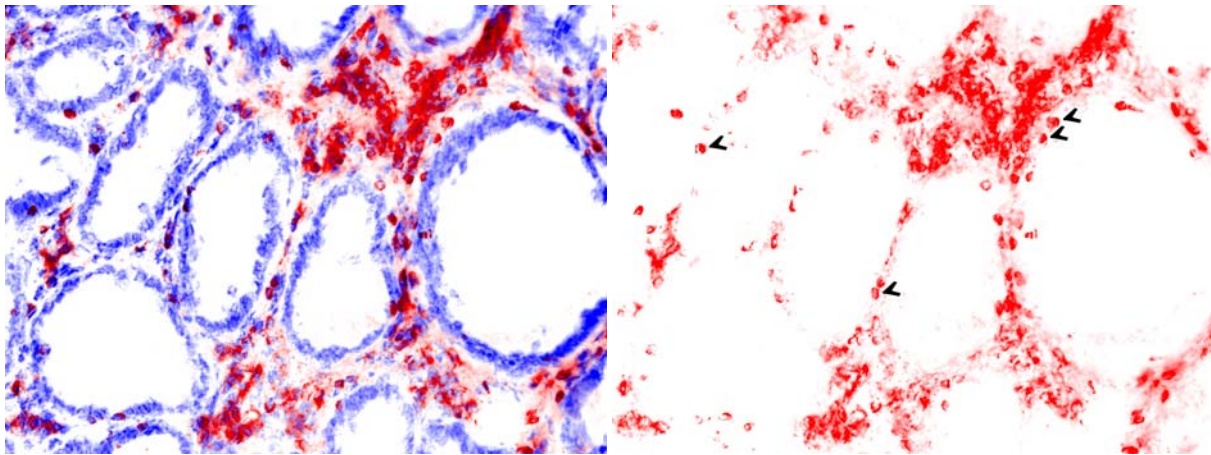


Abb. 4-40. Probe Nr. 596 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

Abb. 4-31 bis 4-40:

Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel, Polypgewebe von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb.4-31 bis 4-39: Proben sind Bcl-2-positiv und zeigen eine cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen. Die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae sind stark Bcl-2-gefärbt (Pfeilköpfe).

Abb. 4-36, links: Doppelfärbung mit Actin (grün). Die Bcl-2-Färbung ist in der Kryptenbasis am stärksten (Pfeile). Die Basis der Krypten grenzt an die Lamina muscularis mucosae. Wegen des hohen Actingehalts der Lamina muscularis mucosae ist diese grün gefärbt.

Abb. 4-40: Probe ist Bcl-2-negativ bezüglich der Färbung in den Krypten. Die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae zeigen starke Bcl-2-Färbung und dienen daher als eine interne Kontrolle (Pfeilköpfe).

Abb. 4-31 bis 4-40, rechts: Nur Bcl-2- Färbung ist dargestellt.

Von den elf **Tumorproben (Adenokarzinom)** sind 73% Bcl-2-positiv (Abb. 4-41 bis 4-48), 27% sind negativ bezüglich einer Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen (Abb. 4-49 bis 4-51). Die Bcl-2-negative Probe Nr. 4163 Tumor (Abb. 4-51) stammt von demselben Patienten wie die einzige Bcl-2-negative Normalprobe Nr. 4163 Normal (Abb. 4-10). Die Lymphozyten sind in allen Proben stark Bcl-2-gefärbt. Die Bcl-2-positiven Proben zeigen eine mehr oder weniger starke cytoplasmatische Färbung der Kryptenepithelzellen. Die Tumorproben sind von Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung.

Bcl-2-positive Proben (Abb. 4-41 bis Abb. 4-48):

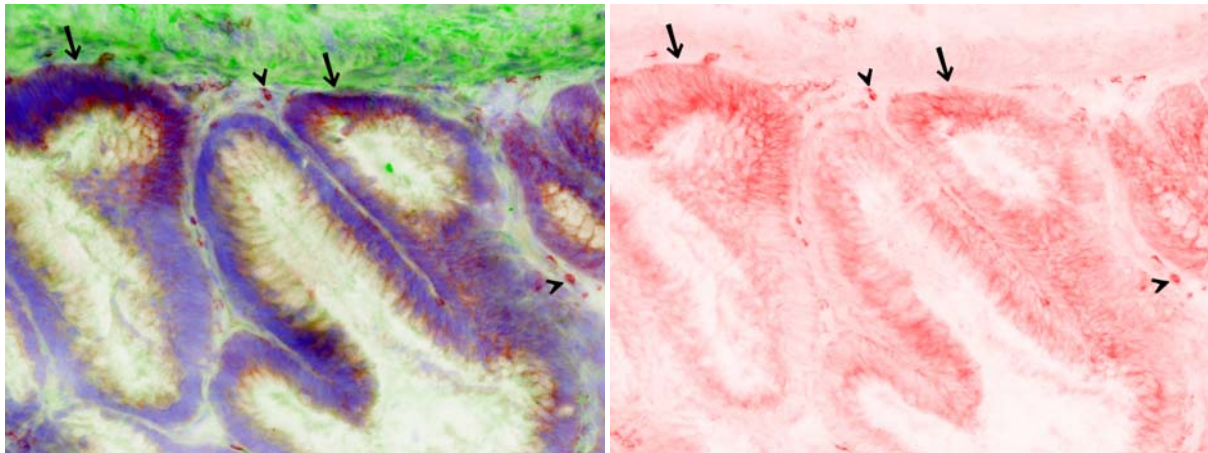


Abb. 4-41.a. Probe Nr. 122 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

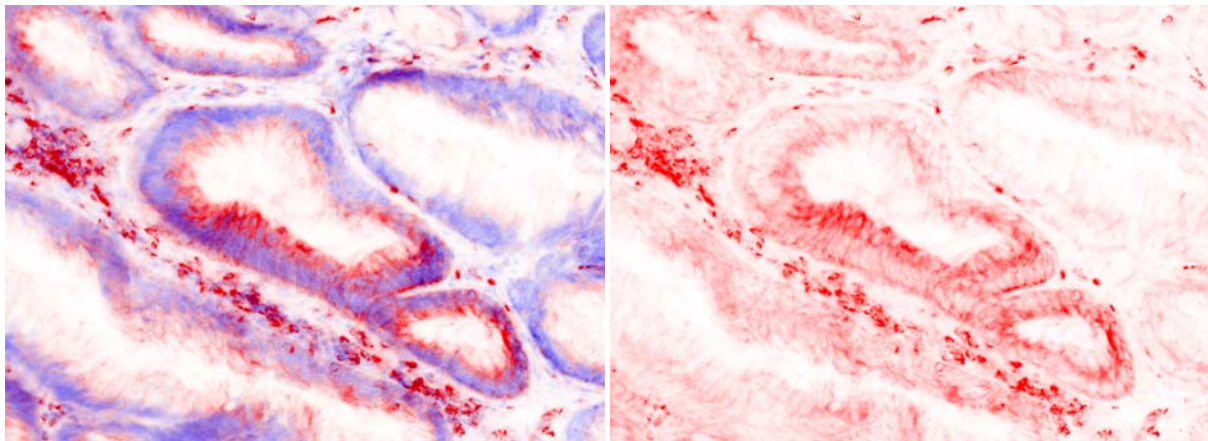


Abb. 4-41.b. Probe Nr. 122 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

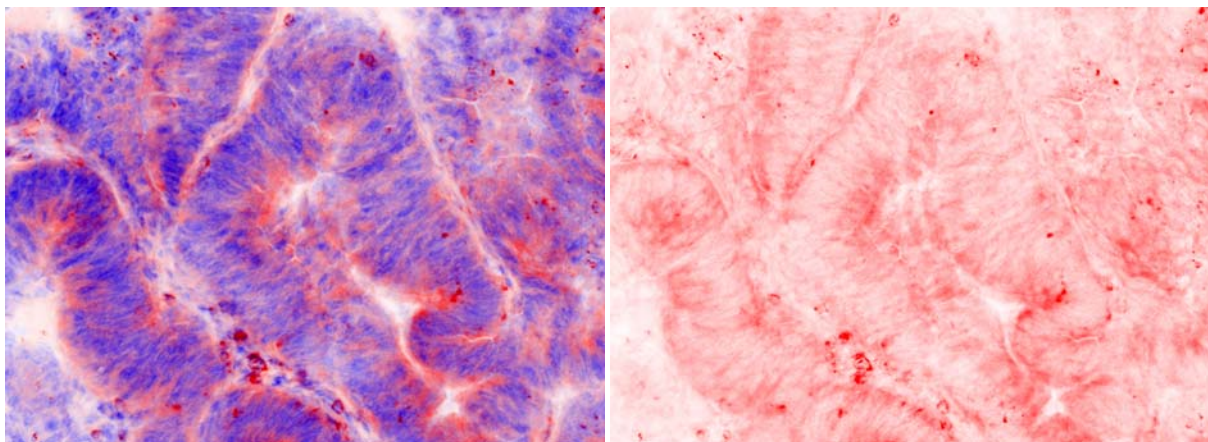


Abb. 4-42. Probe Nr. 3033 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2. Krypten sind in Aufsicht zu sehen (statt im Längs- oder Querschnitt).

Abb. 4-41 bis 4-42: Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

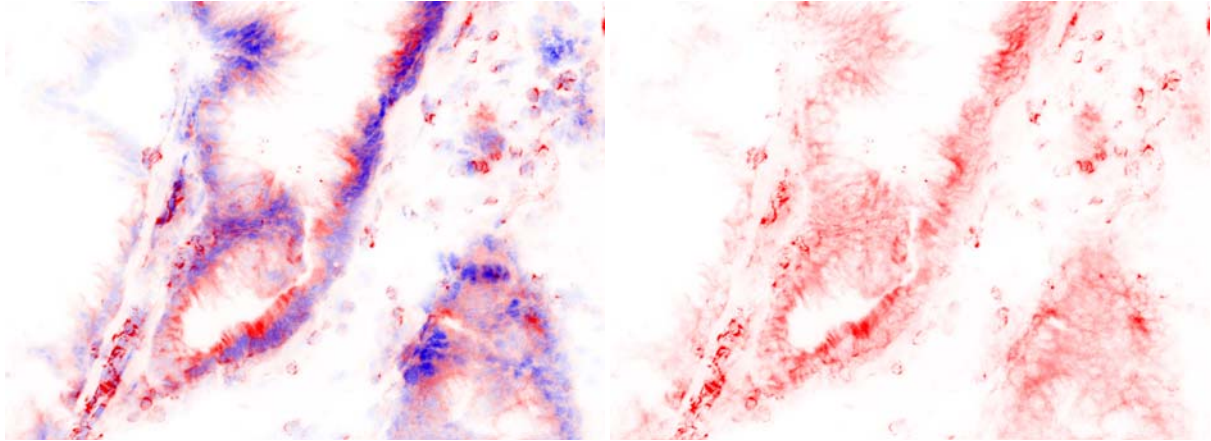


Abb. 4-43.a. Probe Nr. 10402 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

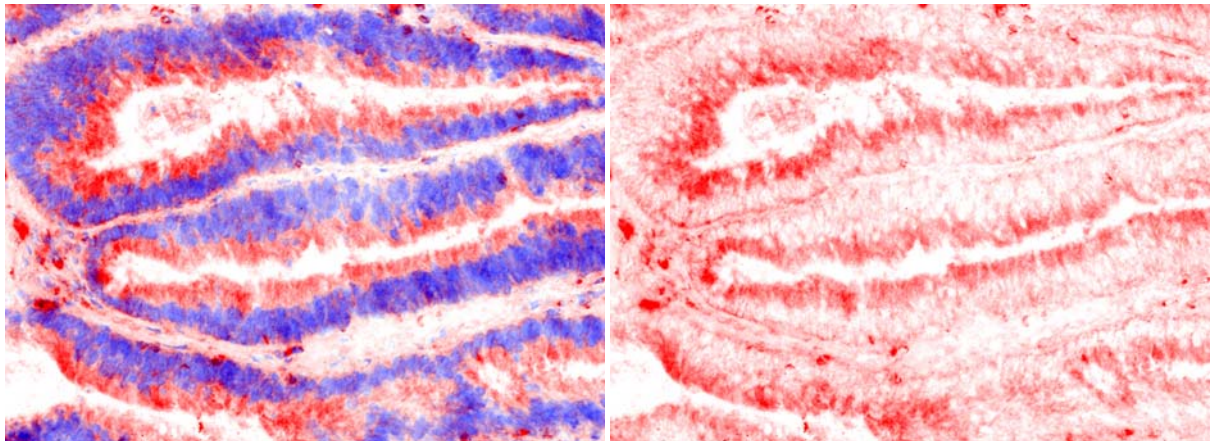


Abb. 4-43.b. Probe Nr. 10402 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

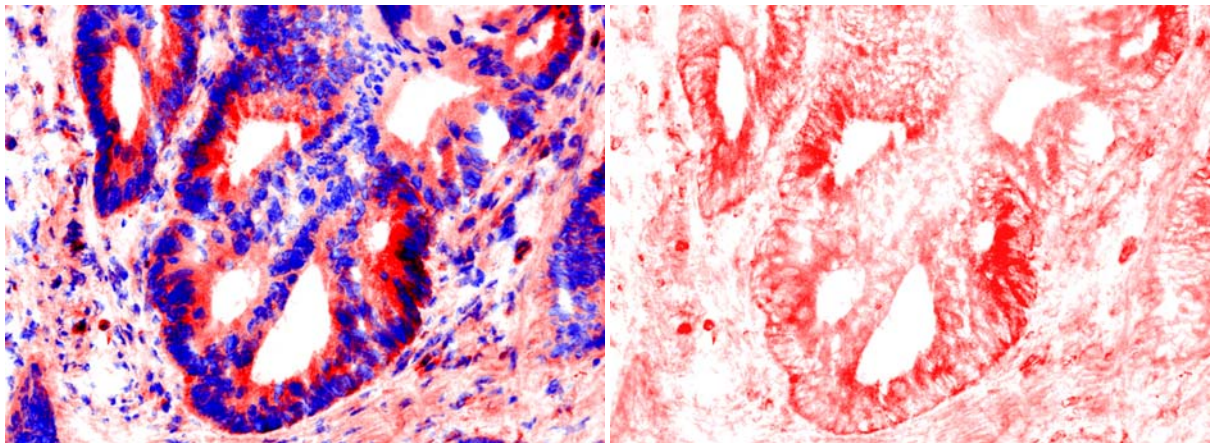


Abb. 4-44.a. Probe Nr. 4236 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

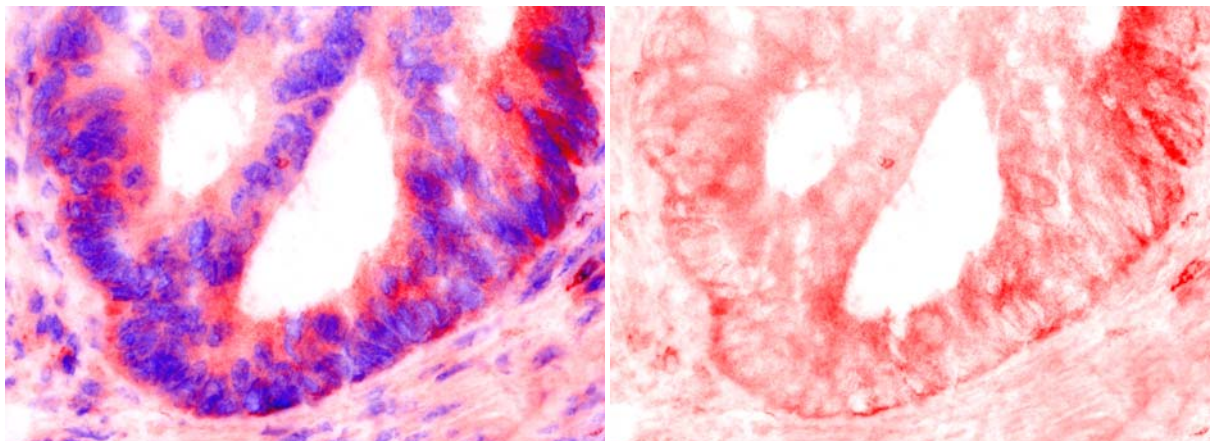


Abb. 4-44.b. Probe Nr. 4236 Tumor. Originalvergrößerung 400 x. IF-Färbung von Bcl-2.

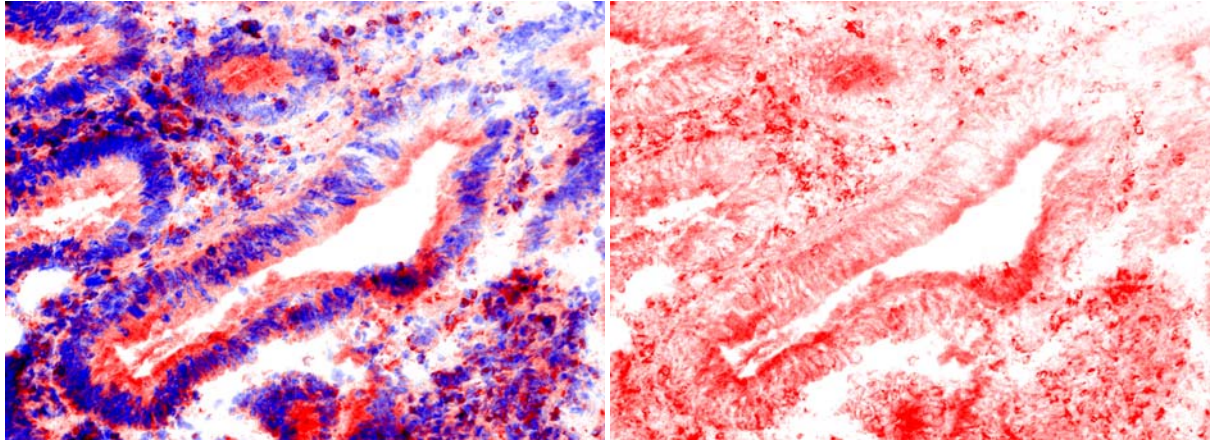


Abb. 4-45. Probe Nr. 4642 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

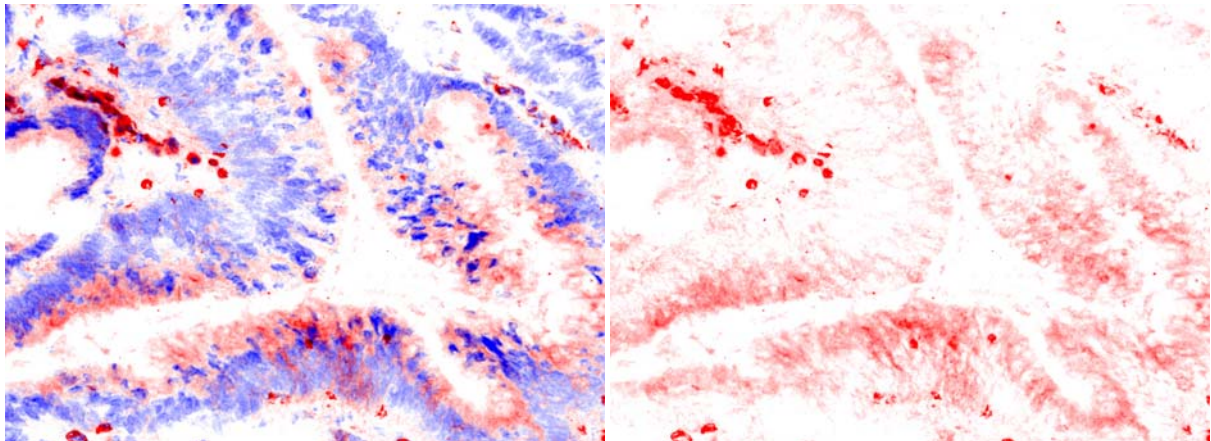


Abb. 4-46. Probe Nr. 4232 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

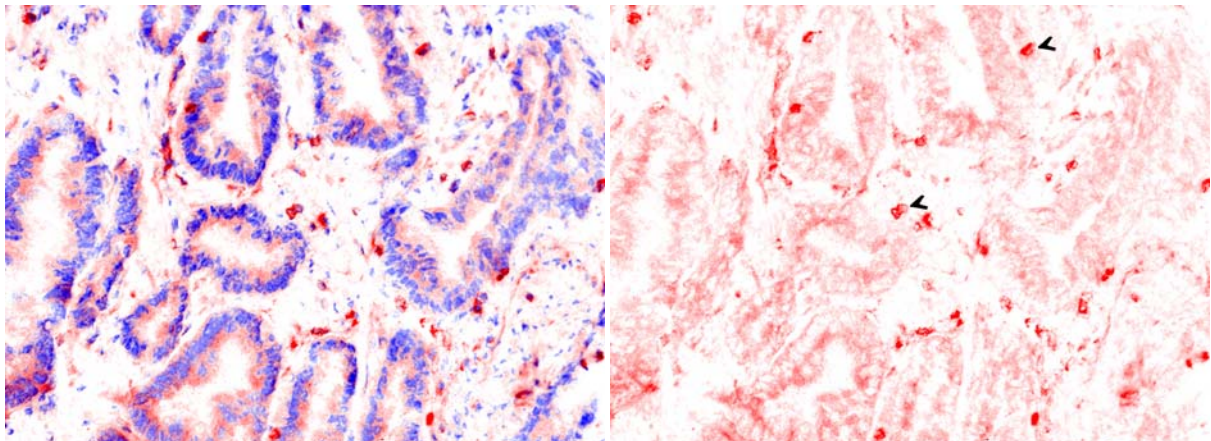


Abb. 4-47. Probe Nr. 4830 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

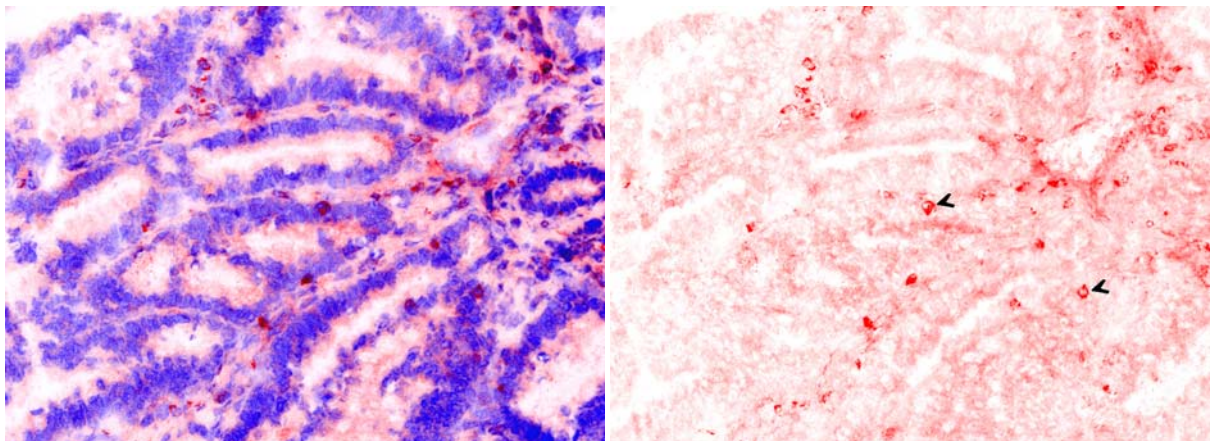


Abb. 4-48. Probe Nr. 6550 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

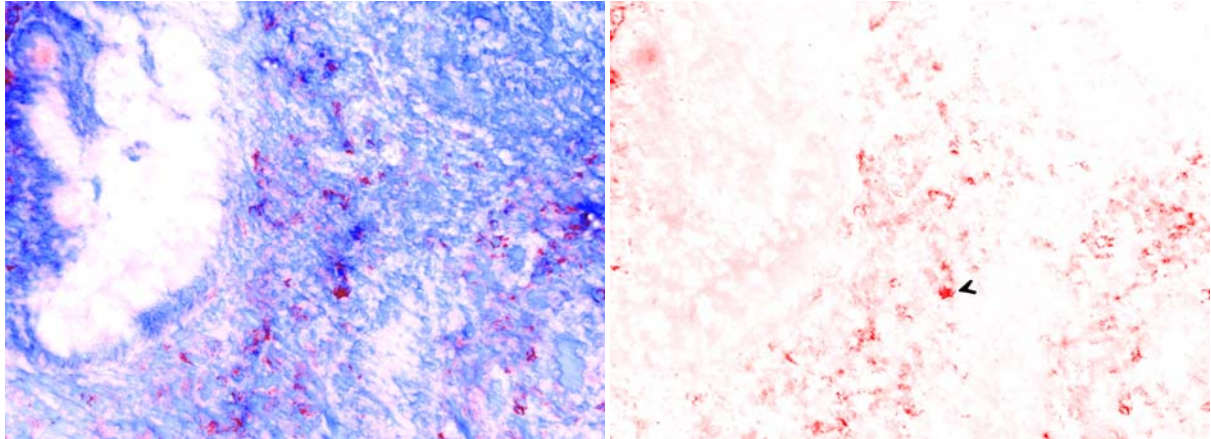
Bcl-2-negative Proben (Abb. 4-49 bis Abb. 4-51):

Abb. 4-49. Probe Nr. 7464 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

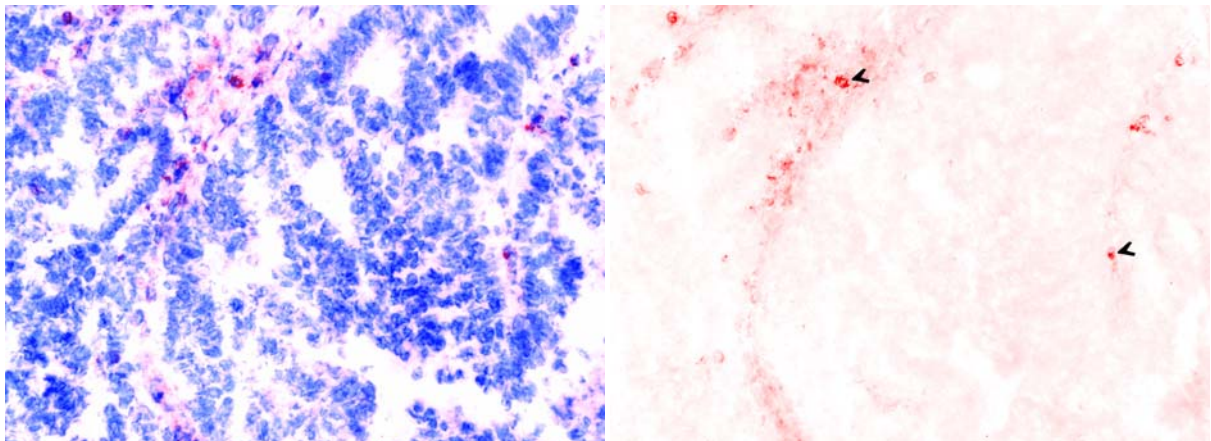


Abb. 4-50. Probe Nr. 6846 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

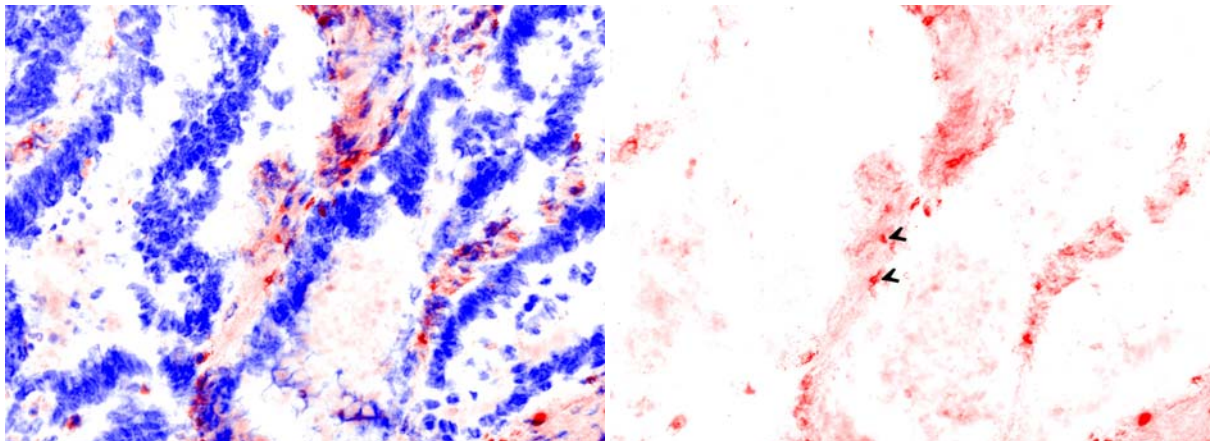


Abb. 4-51. Probe Nr. 4163 Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Bcl-2.

Abb. 4-41 bis 4-51:

Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb.4-41 bis 4-48: Proben sind Bcl-2-positiv und zeigen eine cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen. Die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae sind stark Bcl-2-gefärbt (Pfeilköpfe).

Abb. 4-41.a, links: Doppelfärbung mit Actin (grün). Die Bcl-2-Färbung ist in der Kryptenbasis am stärksten (Pfeile). Die Basis der Krypten grenzt an die Lamina muscularis mucosae. Wegen des hohen Actingehalts der Lamina muscularis mucosae ist diese grün gefärbt.

Abb. 4-49 bis 4-51: Proben sind Bcl-2-negativ bezüglich der Färbung in den Krypten. Die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae zeigen starke Bcl-2-Färbung (Pfeilköpfe).

Abb. 4-41 bis 4-51, rechts: Nur Bcl-2- Färbung ist dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich über die Bcl-2-Färbung in den vier Gruppen Normal, CED, Polyp und Tumor sagen, dass bei den CED-Proben und den Tumorproben der Anteil der Proben, die Bcl-2-negativ sind bezüglich einer Färbung der Kryptenepithelzellen höher ist (25%) als bei den Normal- und Polypproben (10%).

4.1.2. Peroxidasefärbung von Bcl-2

Zur Absicherung des Ergebnisses der Immunfluoreszenzfärbungen wird als eine positive Kontrolle stichprobenartig eine Peroxidasefärbung mit denselben Proben und demselben Primärantikörper durchgeführt. Es werden Proben von Normal-, CU-, Polyp- und Tumorgeewebe untersucht. Das Ergebnis der Peroxidasefärbung entspricht dem der Immunfluoreszenzfärbung: Die in der Immunfluoreszenz positiven Proben zeigen auch in der Peroxidasefärbung eine cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen (Abb. 4-52 bis 4-56), wobei die Kriptenbasis am stärksten gefärbt ist (Abb. 4-52, siehe Pfeil). Die Lymphozyten der Lamina propria sind auch in der Peroxidasefärbung stark Bcl-2-positiv (siehe Pfeilköpfe).

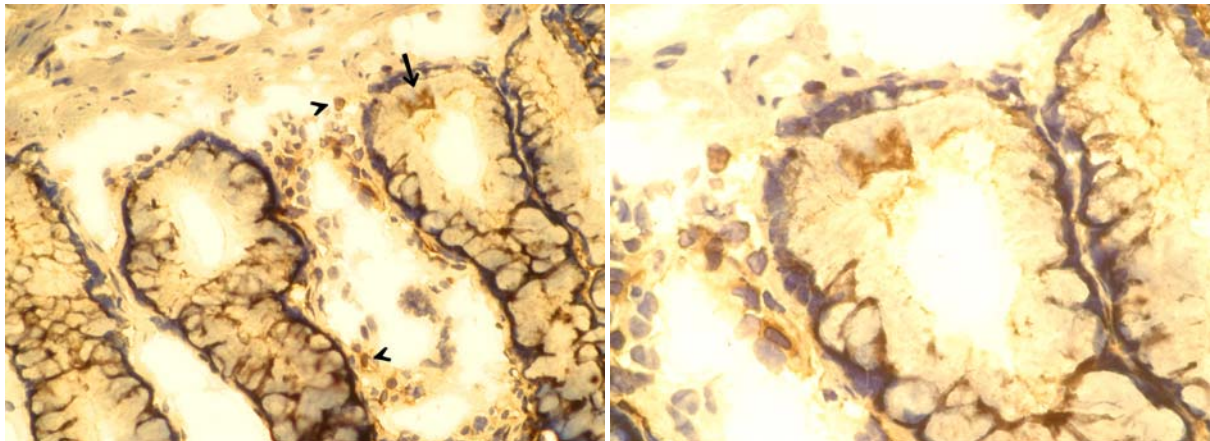


Abb. 4-52. Probe Nr. 10402 Normal. Originalvergrößerung 200 x und 400 x.

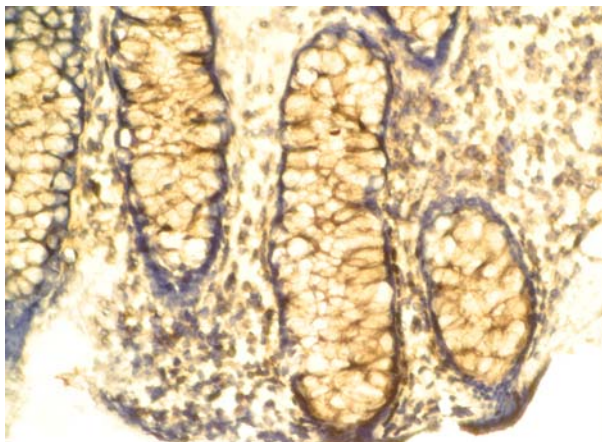


Abb. 4-53. Probe Nr.577 CU. Originalvergrößerung 200 x.

Abb. 4-52 bis 4-53: Peroxidasefärbung von Bcl-2 (braun) im Kolonepithel. Gegenfärbung der Zellkerne mit Meyers Hämalaun (blau). Gefrierschnitt. Die Proben zeigen cytoplasmatische Bcl-2-Färbung. Die Kriptenbasis ist stark Bcl-2-gefärbt (Pfeil), ebenso die Lymphozyten in der Lamina propria mucosae (Pfeilköpfe).

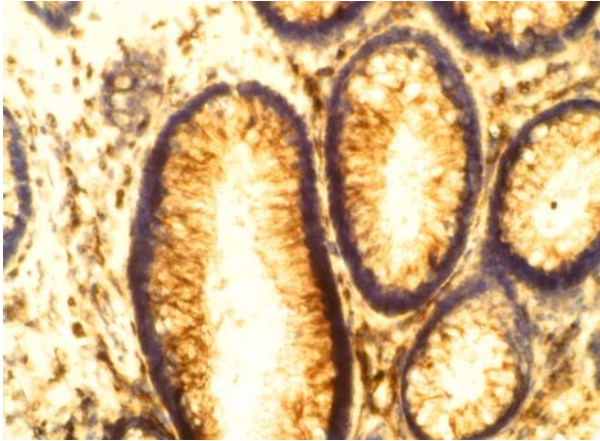


Abb. 4-54. Probe Nr. 521 Polyp. Originalvergrößerung 200 x. POD-Färbung von Bcl-2.

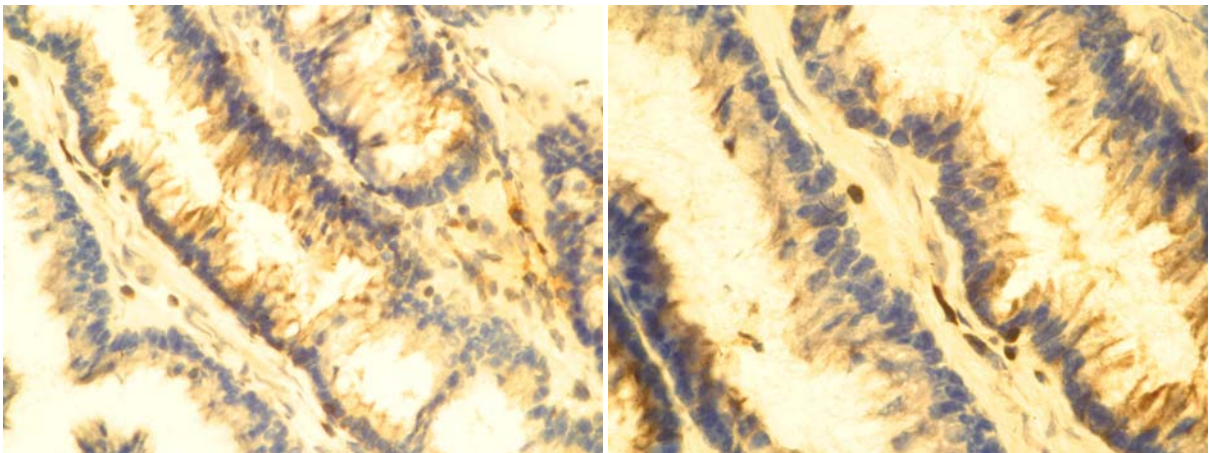


Abb. 4-55. Probe Nr. 10402 Tumor. Originalvergrößerung 200 x und 400 x. POD-Färbung von Bcl-2.

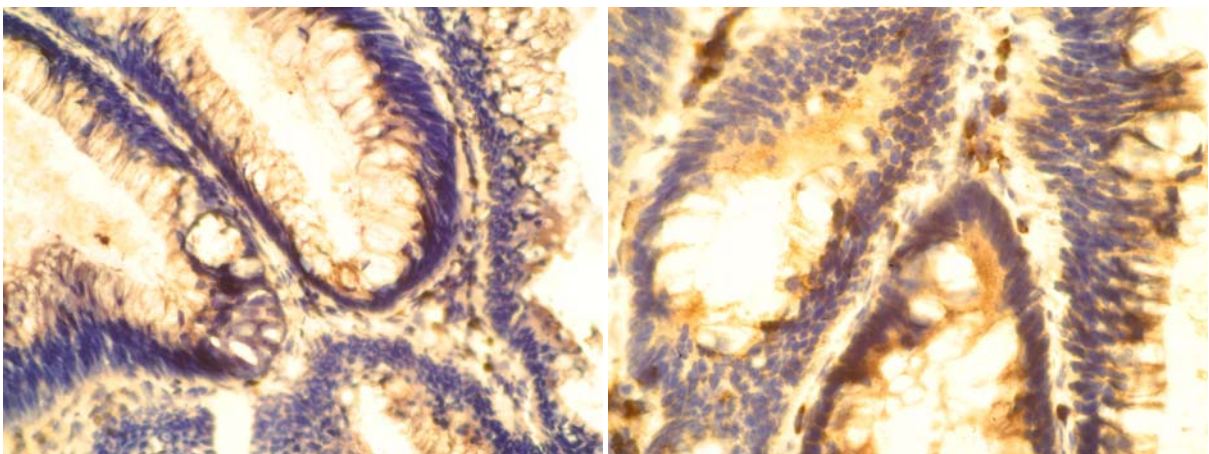


Abb. 4-56. Probe Nr. 122 Tumor. Originalvergrößerung 400 x. POD-Färbung von Bcl-2.

Abb. 4-52 bis 4-56:

Peroxidasefärbung von Bcl-2 (braun) im Kolonepithel. Gegenfärbung der Zellkerne mit Meyers Hämalaun (blau). Gefrierschnitt.

Alle Proben zeigen eine cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen. Die Lymphozyten der Lamina propria mucosae sind stark Bcl-2-positiv (Pfeilköpfe).

Abb. 4-52: Starke Bcl-2-Färbung der Kryptenbasis (Pfeil).

4.1.3. Immunfluoreszenzfärbung von Survivin

Die Survivinfärbung im Kolonepithel kann die Zellkerne betreffen und das Cytoplasma der Kryptenepithelzellen. Die cytoplasmatische Survivinfärbung kann mehr oder weniger stark ausgeprägt sein, ebenso die Zellkernfärbung.

Die insgesamt zehn Proben **normales Kolonepithel von Menschen ohne CED** lassen sich bezüglich der Survivinfärbung in zwei Gruppen einteilen: 80% der Proben zeigen Survivinfärbung im Zellkern und im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen (Abb. 4-57 bis Abb. 4-64). 20% der Proben haben nur cytoplasmatische Survivinfärbung, aber keine Survivin-Zellkernfärbung (Abb. 4-65 bis Abb. 4-66).

Die Zellkernfärbung ist in einigen Bildern exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet.

Survivinfärbung im Zellkern und im Cytoplasma (Abb. 4-57 bis Abb. 4-64):

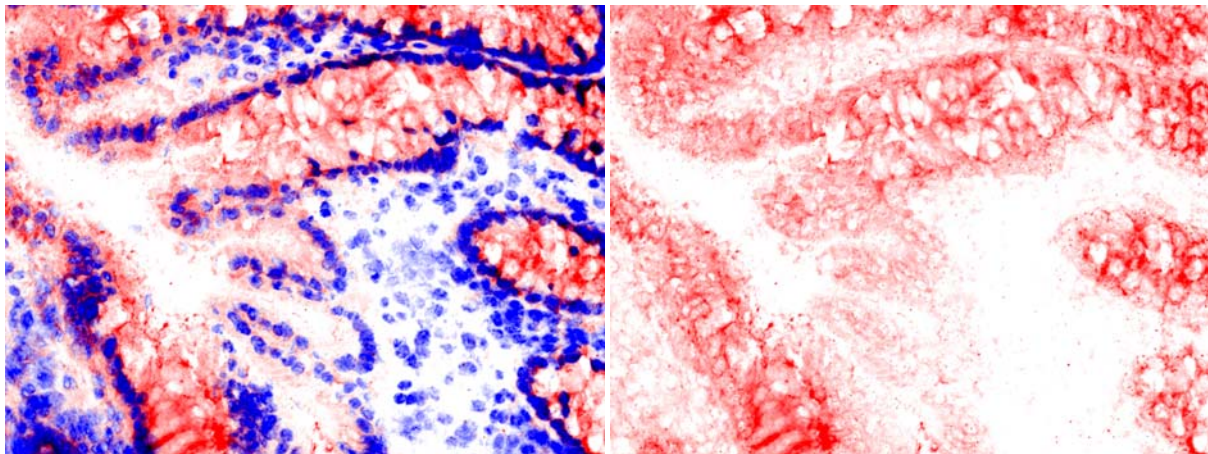


Abb. 4-57.a. Probe Nr. 4830 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

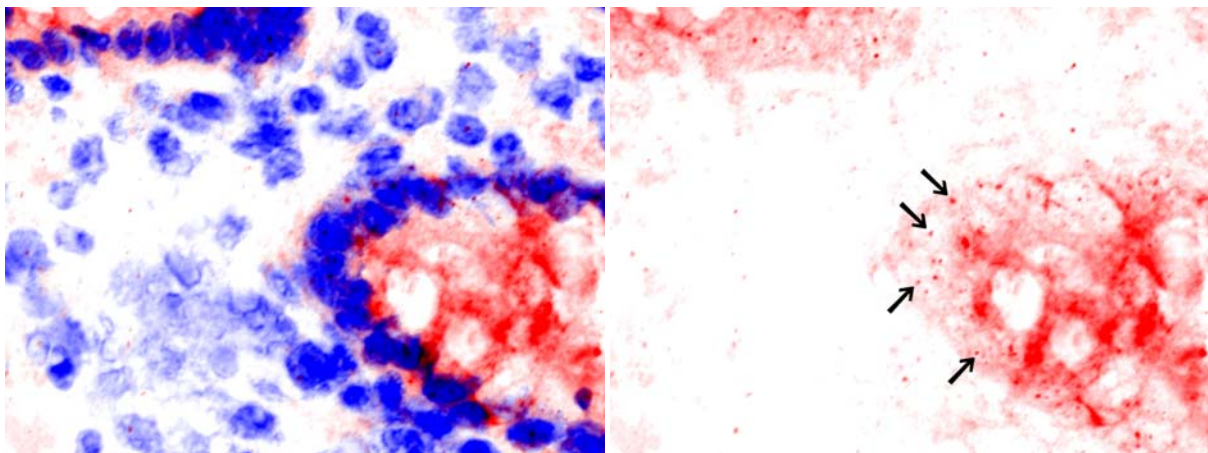


Abb. 4-57.b. Probe Nr. 4830 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-57.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-57: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe eines Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt. Die Survivin-Zellkernfärbung ist exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet.

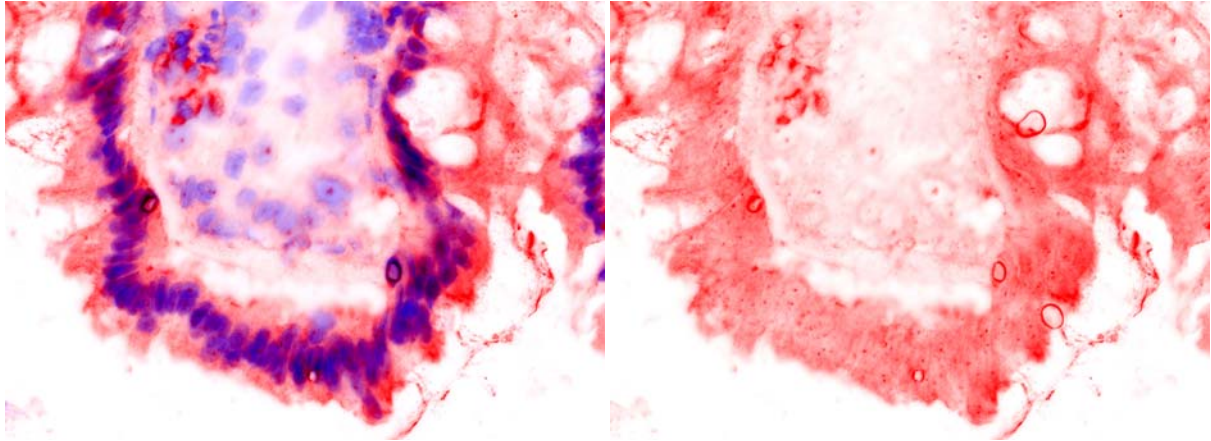


Abb. 4-58.a. Probe Nr. 10402 Normal. Originalvergrößerung 400 x. IF-Färbung von Survivin.

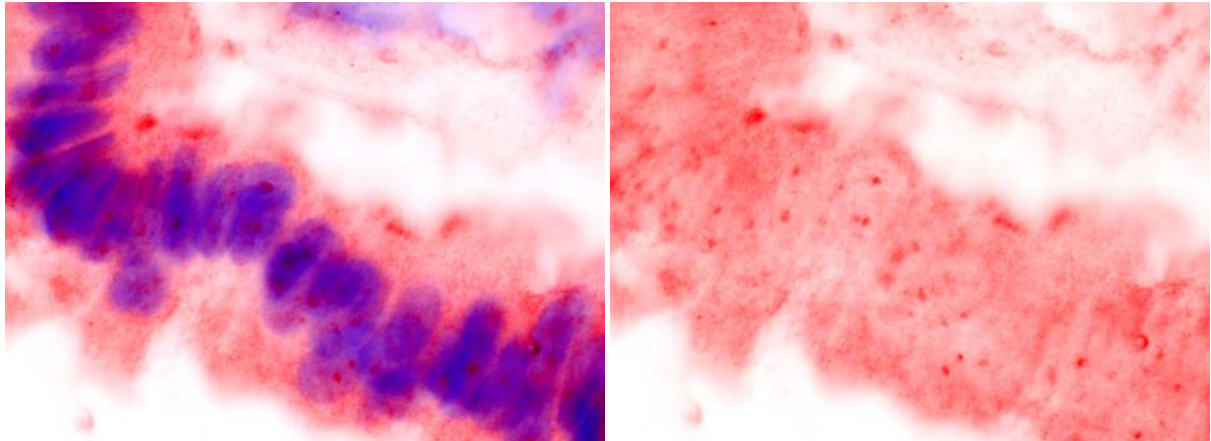


Abb. 4-58.b. Probe Nr. 10402 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-58.a. IF-Färbung von Survivin.

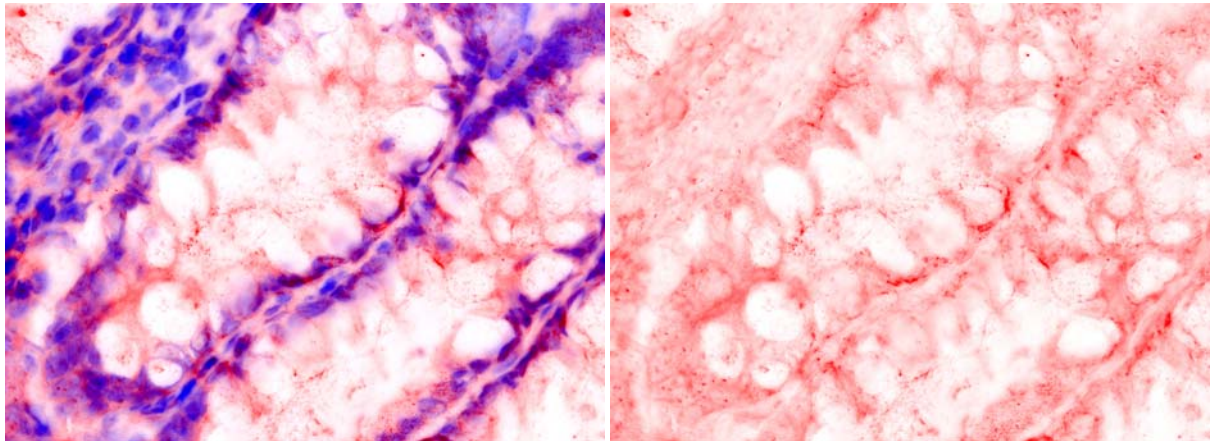


Abb. 4-58.c. Probe Nr. 10402 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

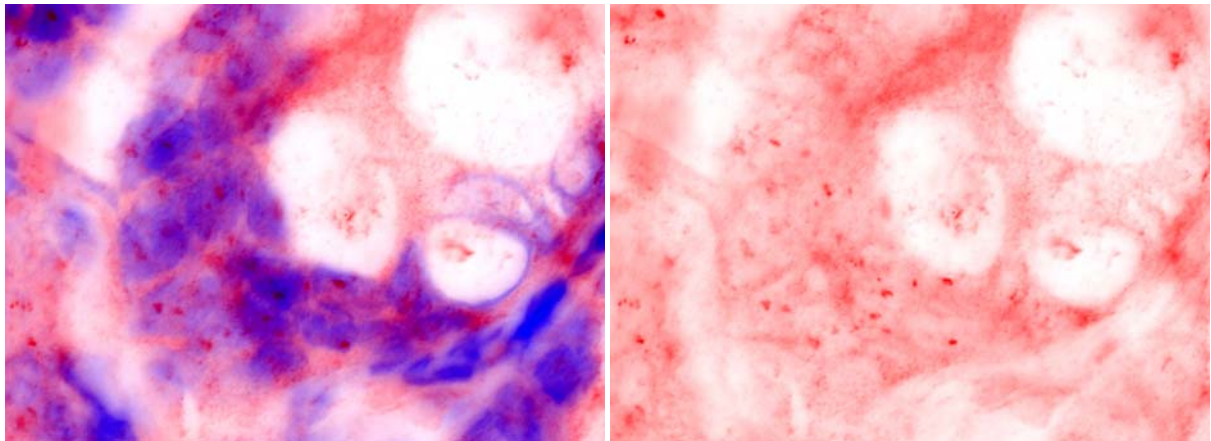


Abb. 4-58.d. Probe Nr. 10402 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-58.c. IF-Färbung von Survivin.

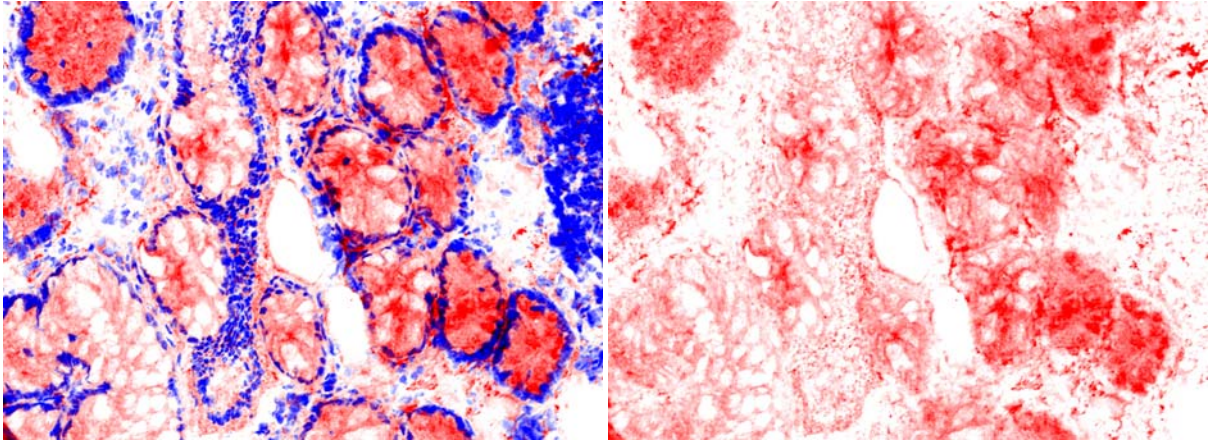


Abb. 4-59.a. Probe Nr. 326 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

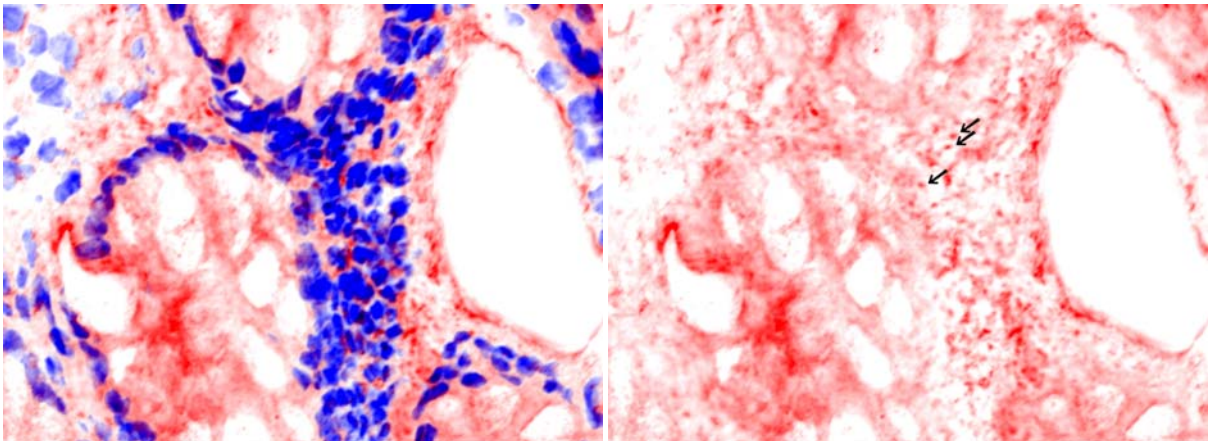


Abb. 4-59.b. Probe Nr. 326 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-59.a. IF-Färbung von Survivin.

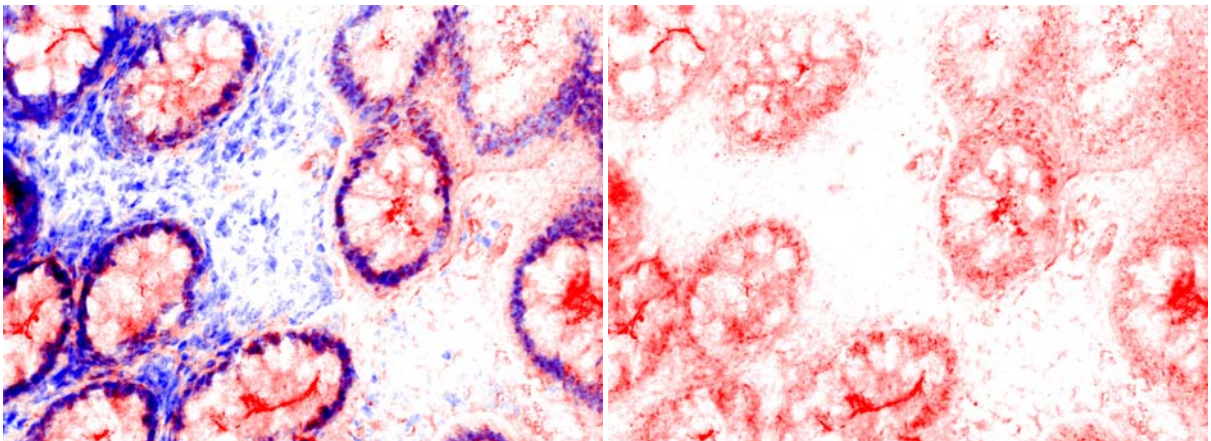


Abb. 4-60.a. Probe Nr. 4236 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

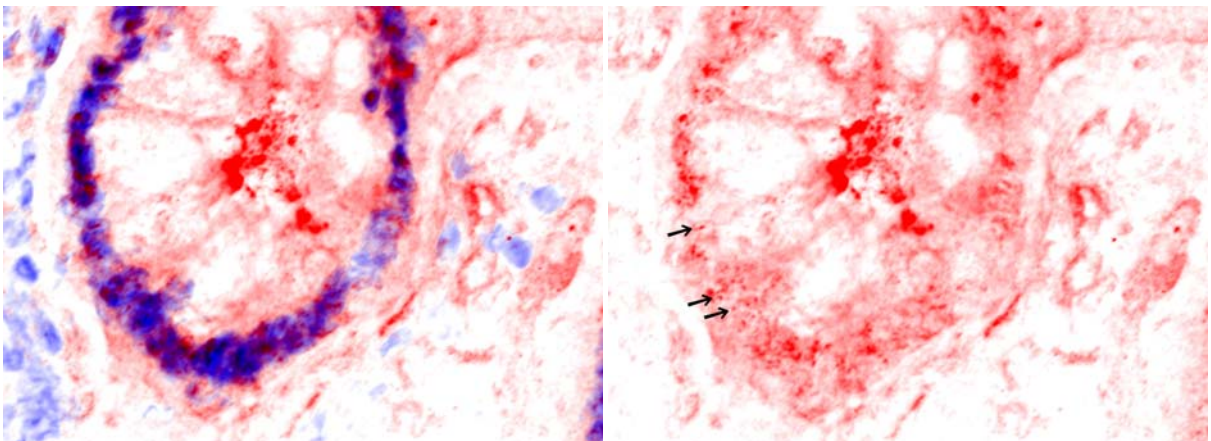


Abb. 4-60.b. Probe Nr. 4236 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-60.a. IF-Färbung von Survivin.

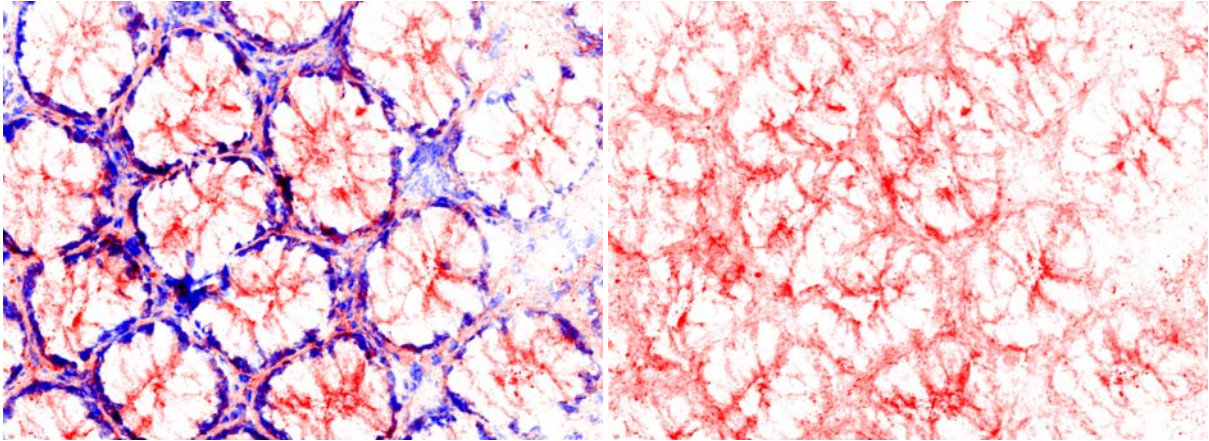


Abb. 4-61.a. Probe Nr. 3033 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

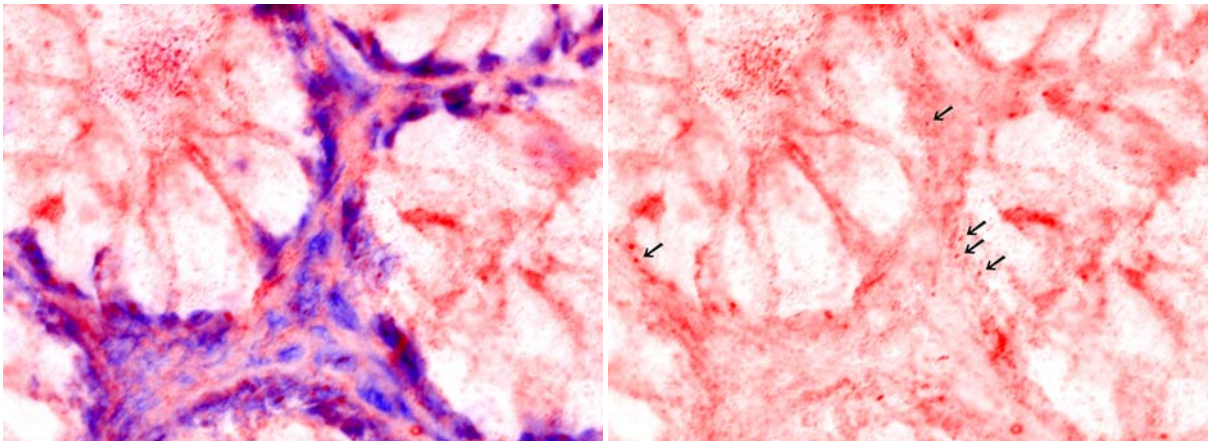


Abb. 4-61.b. Probe Nr. 3033 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-61.a. IF-Färbung von Survivin.

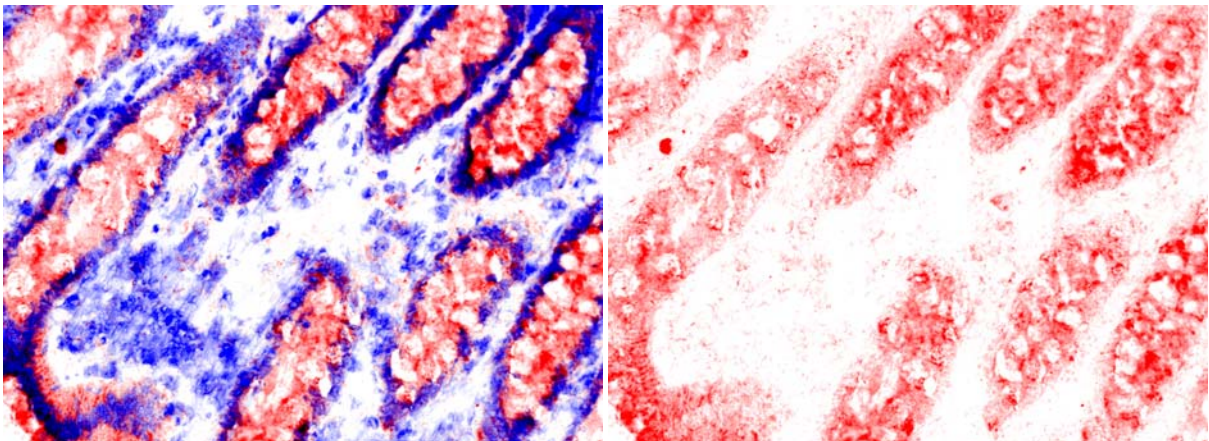


Abb. 4-62.a. Probe Nr. 2842 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

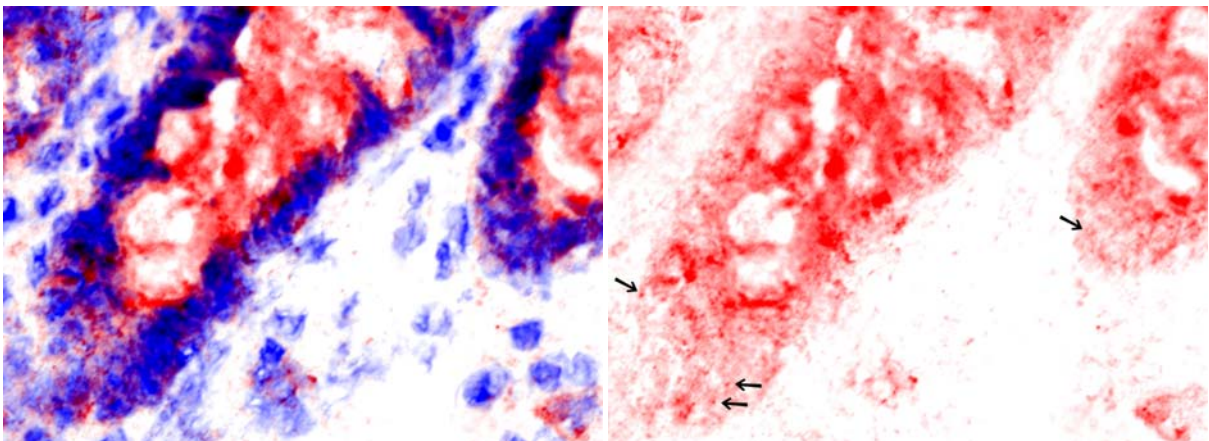


Abb. 4-62.b. Probe Nr. 2842 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-62.a. IF-Färbung von Survivin.

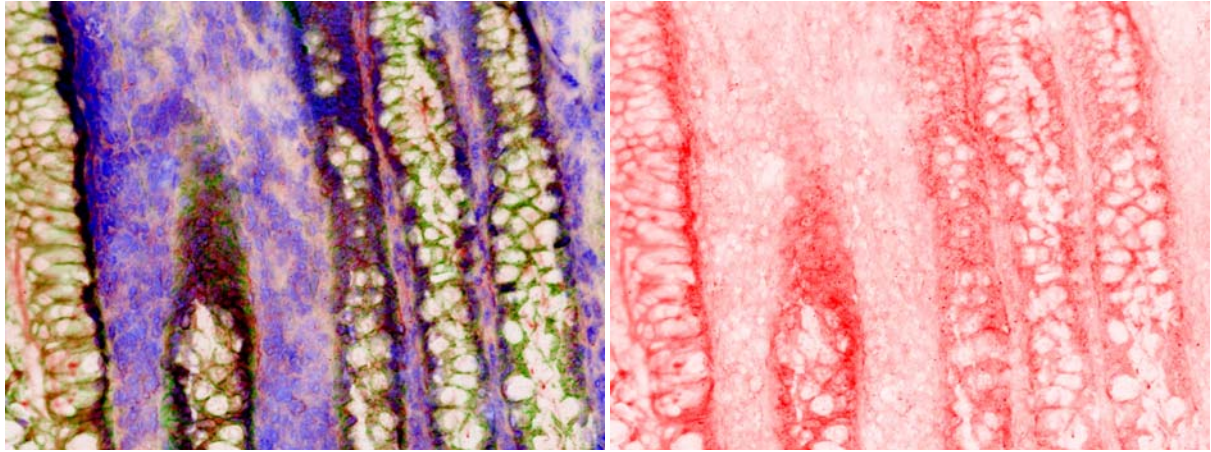


Abb. 4-63.a. Probe Nr. 4346 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

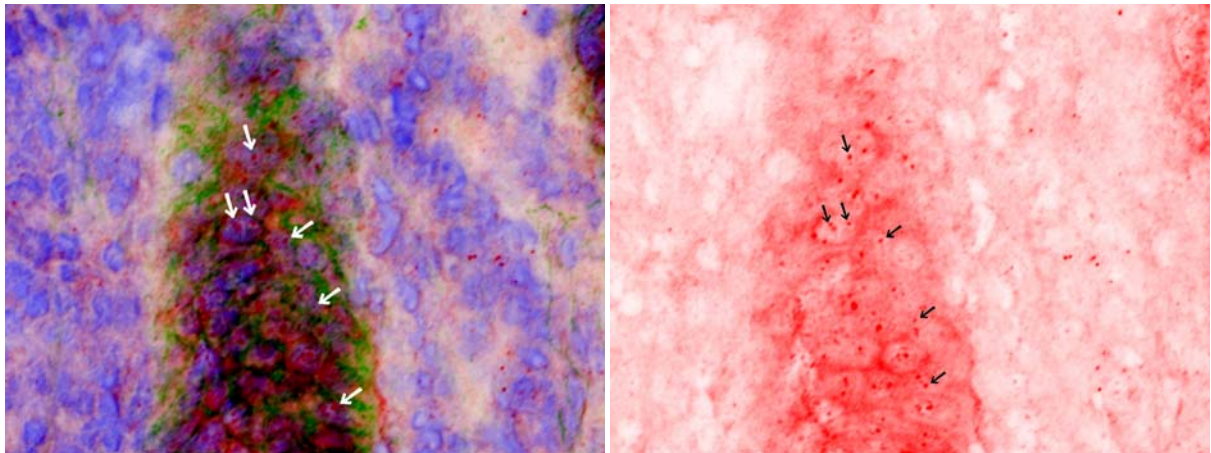


Abb. 4-63.b. Probe Nr. 4346 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-63.a. IF-Färbung von Survivin.

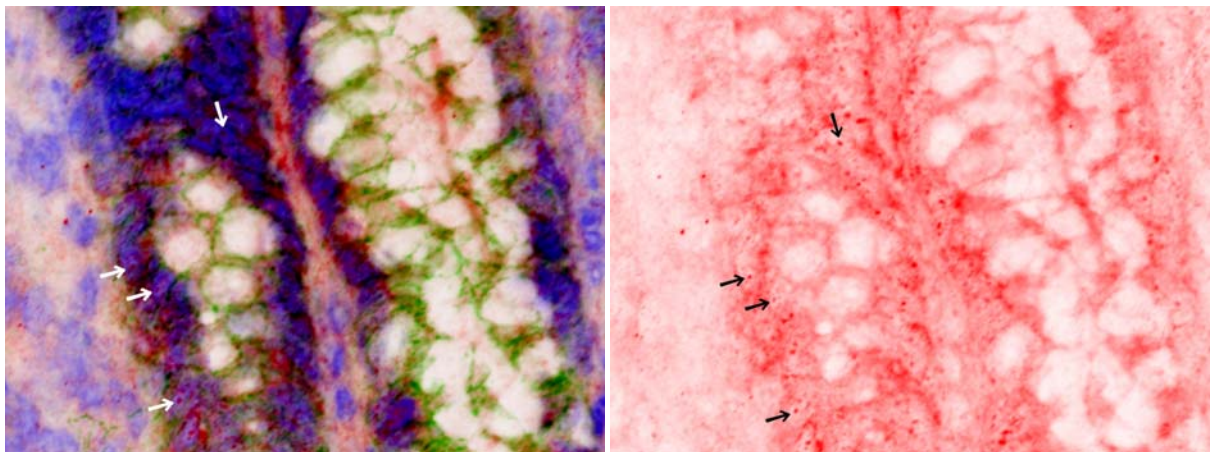


Abb. 4-63.c. Probe Nr. 4346 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-63.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-63: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe eines Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Die Survivin-Zellkernfärbung ist exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Auch das Cytoplasma der Kryptenepithelzellen ist Survivin-gefärbt.

Abb. rechts: Nur Survivin-färbung ist dargestellt.

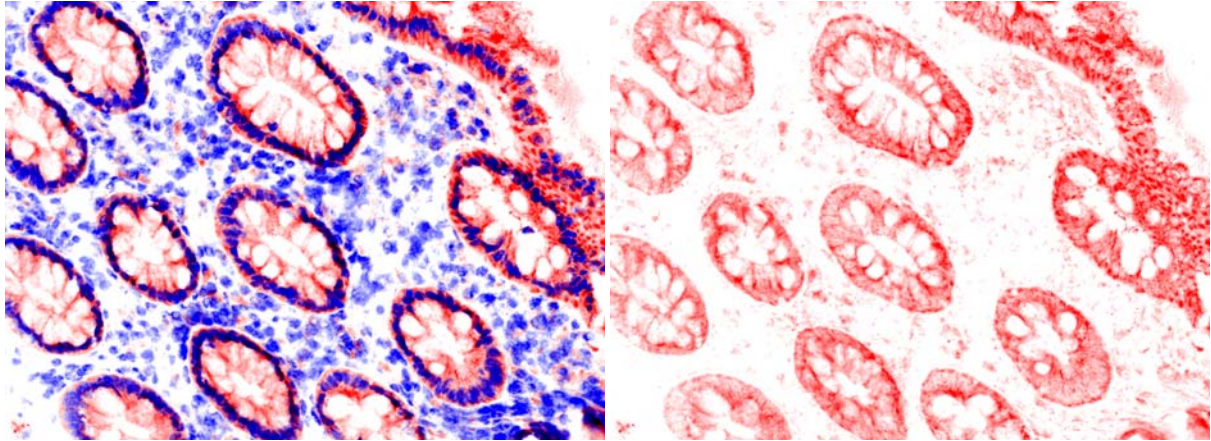


Abb. 4-64.a. Probe Nr. 4232 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

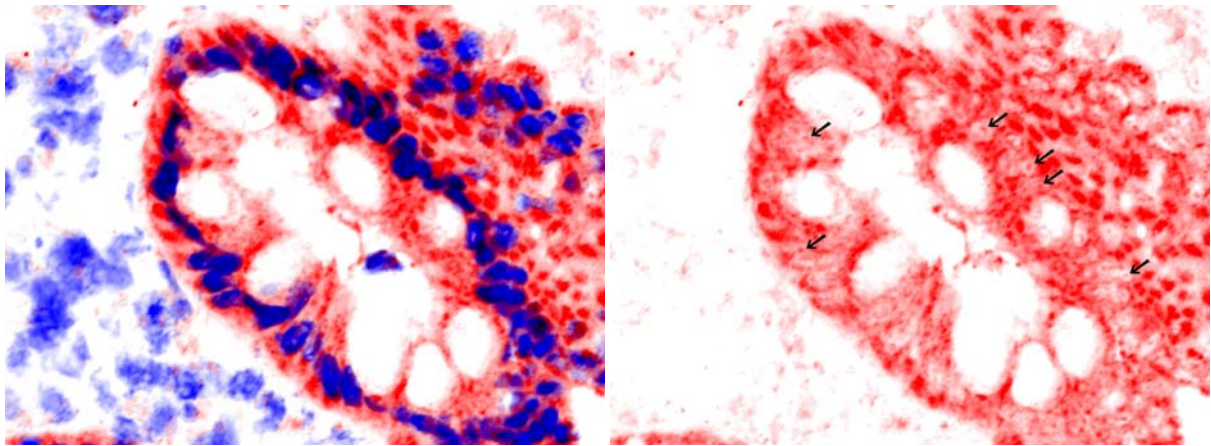


Abb. 4-64.b. Probe Nr. 4232 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-64.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-64: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe eines Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Die Survivin-Zellkernfärbung ist exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Es ist außerdem starke cytoplasmatische Survivinfärbung vorhanden.

Abb. rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt.

Keine Survivin-Färbung im Zellkern, aber Färbung im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen (Abb. 4-65 bis Abb. 4-66):

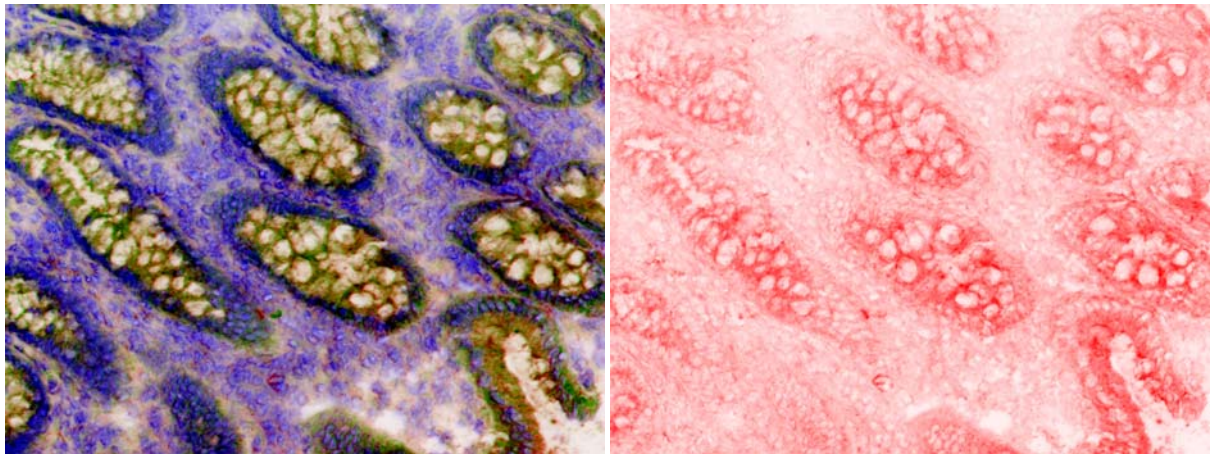


Abb. 4-65.a. Probe Nr. 4248 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

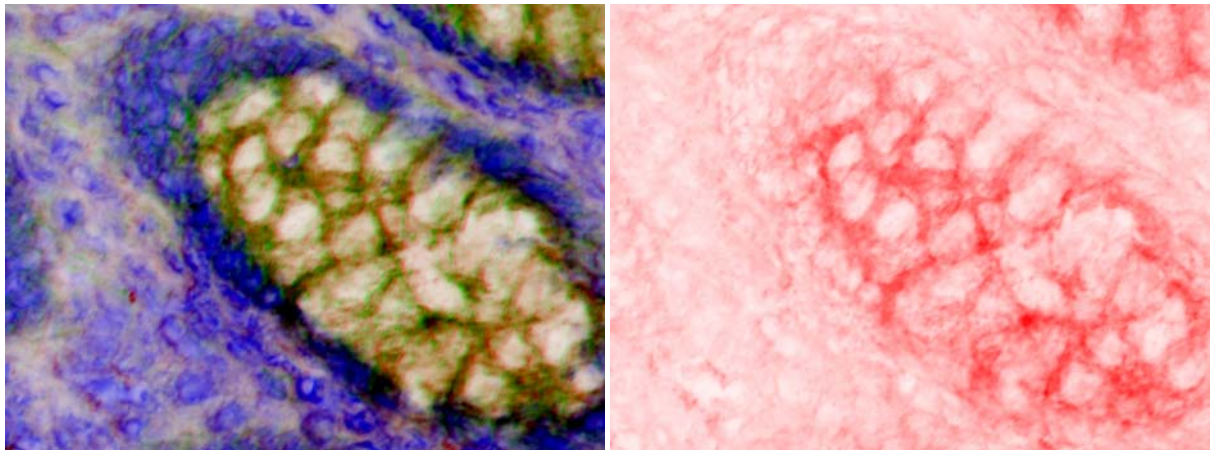


Abb. 4-65.b. Probe Nr. 4248 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-65.a. IF-Färbung von Survivin.

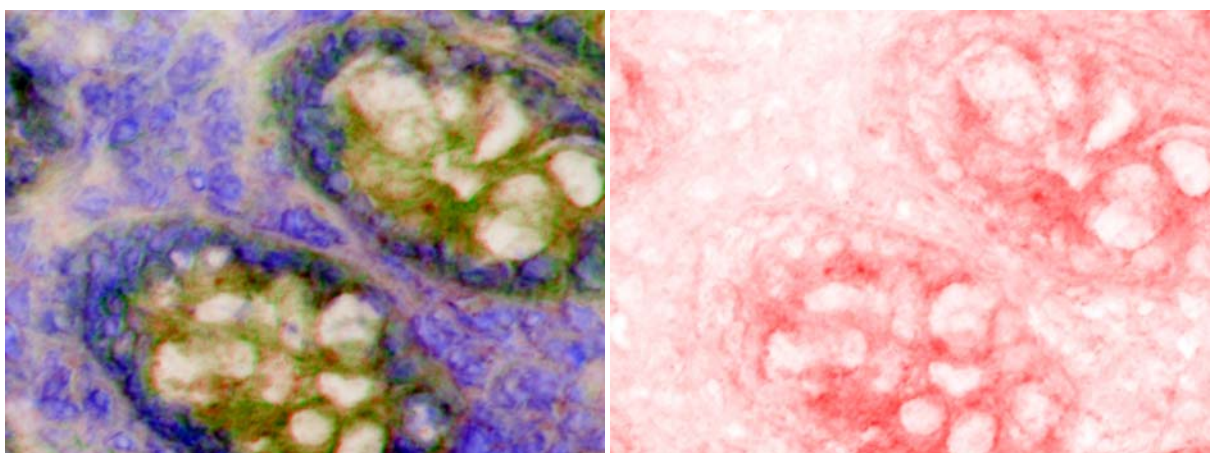


Abb. 4-65.c. Probe Nr. 4248 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-65.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-65: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe eines Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt. Es gibt keine Survivin-Zellkernfärbung. Es ist aber starke cytoplasmatische Survivin-Färbung der Kryptenepithelzellen vorhanden.

Abb. rechts: Nur Survivin-Färbung ist dargestellt.

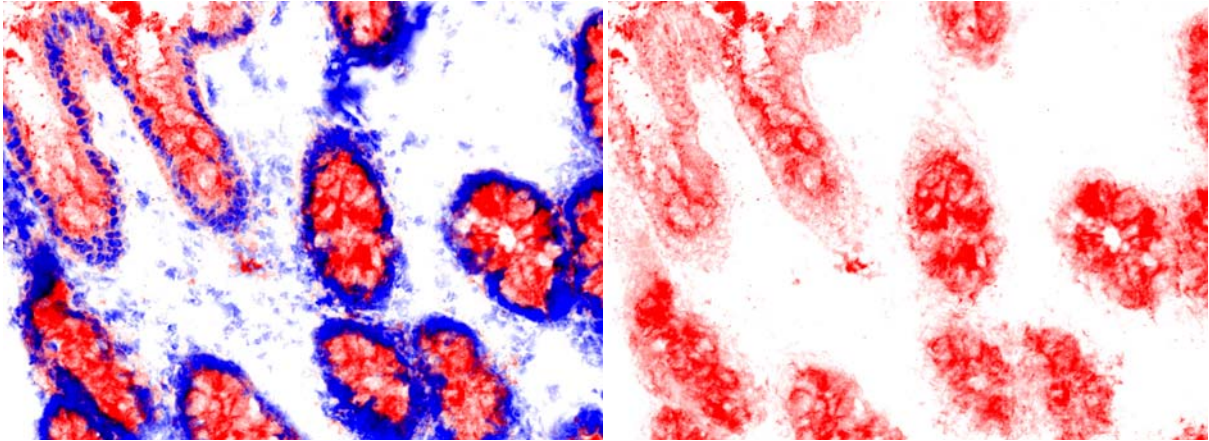


Abb. 4-66.a. Probe Nr. 4163 Normal. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

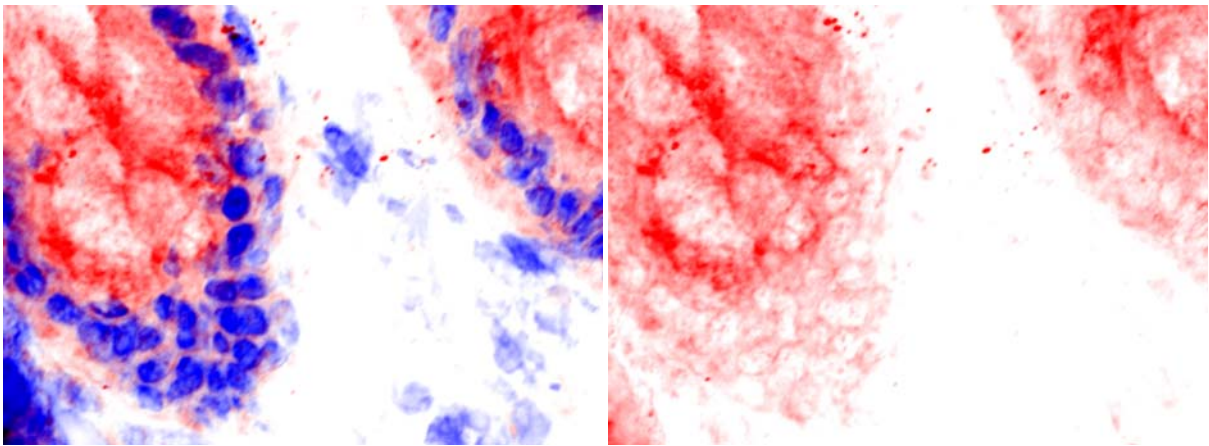


Abb. 4-66.b. Probe Nr. 4163 Normal. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-66.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-57 bis Abb. 4-66:

Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. 4-57 bis 4-64: Proben mit Survivinfärbung im Zellkern und im Cytoplasma.

Abb. 4-65 bis 4-66: Keine Survivinfärbung im Zellkern, aber Survivinfärbung im Cytoplasma.

Abb. 4-63 und 4-65, links: Doppelfärbung mit β -Catenin (grün).

Abb. 4-57 bis 4-66, rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt.

Unter den 20 **Kolonepithelproben von Menschen mit Colitis Ulcerosa (CU)** gibt es bezüglich der Survivinfärbung fünf Varianten: Wie bei den Normalproben zeigt der überwiegende Teil (55%) der CU-Proben Survivin färbung im Zellkern und im Cytoplasma (Abb. 4-67 bis Abb. 4-77). 20% der Proben haben ebenfalls Survivin färbung im Zellkern und starke Färbung im Cytoplasma (Abb. 4-78 bis Abb. 4-81). 10% der Proben haben keine Survivin-Zellkernfärbung, aber Survivin färbung im Cytoplasma (Abb. 4-82 bis Abb. 4-83). 5% der Proben zeigen keine Survivin-Zellkernfärbung, aber starke Survivin färbung im Cytoplasma (Abb. 4-84). 10% der Proben sind, was die Survivin färbung betrifft, negativ (Abb. 4-85 bis Abb. 4-86). Die zwei untersuchten Polypproben von CU-Patienten haben Survivin färbung im Zellkern und im Cytoplasma (Abb. 4-77) bzw. Survivin färbung im Zellkern und starke Färbung im Cytoplasma (Abb. 4-79), ebenso drei Pseudopolypproben (Abb. 4-71, 4-78, 4-80); zwei Pseudopolypproben haben keine Survivin färbung (Abb. 4-85 und Abb. 4-86).

Insgesamt zeigen 75% der Proben eine Survivin färbung im Zellkern und Cytoplasma; 15% zeigen keine Zellkernfärbung, sondern nur cytoplasmatische Färbung und 10% sind ohne Survivin färbung. Die Survivin färbung im Zellkern ist in einigen Bildern exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet.

Survivin färbung im Zellkern und im Cytoplasma (Abb. 4-67 bis Abb. 4-77):

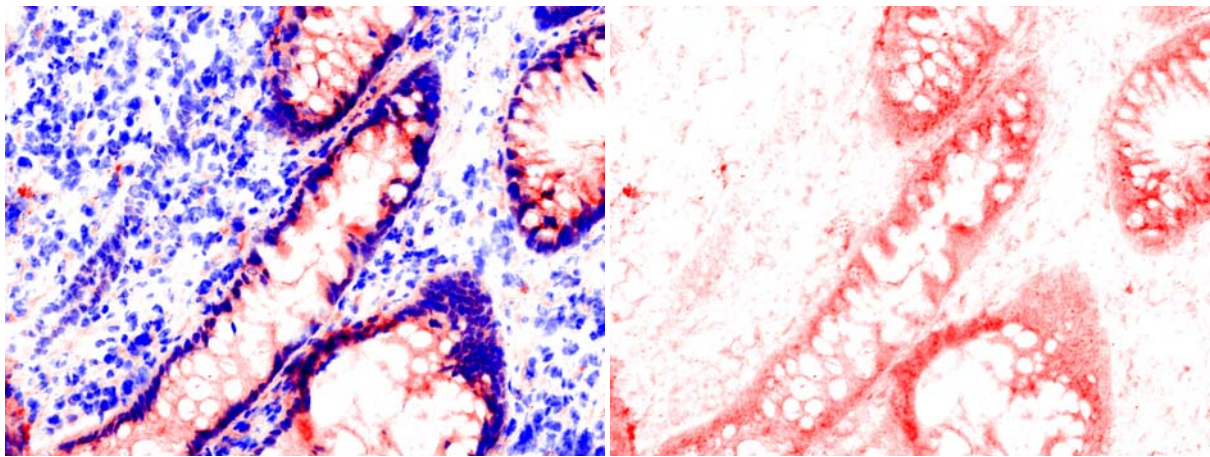


Abb. 4-67.a. Probe Nr. 527 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

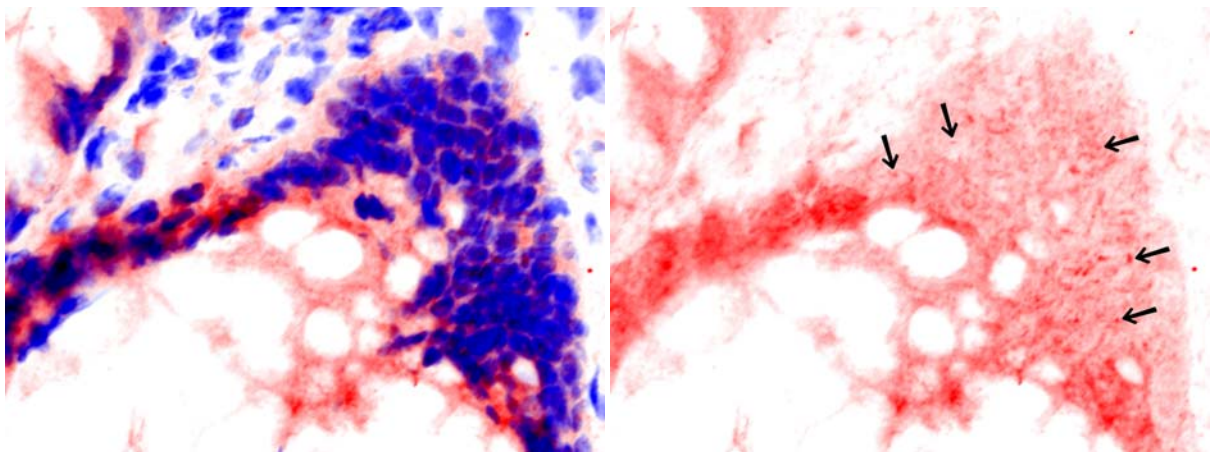


Abb. 4-67.b. Probe Nr. 527 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-67.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-67: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Gewebe eines CU-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Survivin färbung ist dargestellt. Die Zellkernfärbung ist exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Es gibt außerdem cytoplasmatische Survivin färbung der Kryptenepithelzellen.

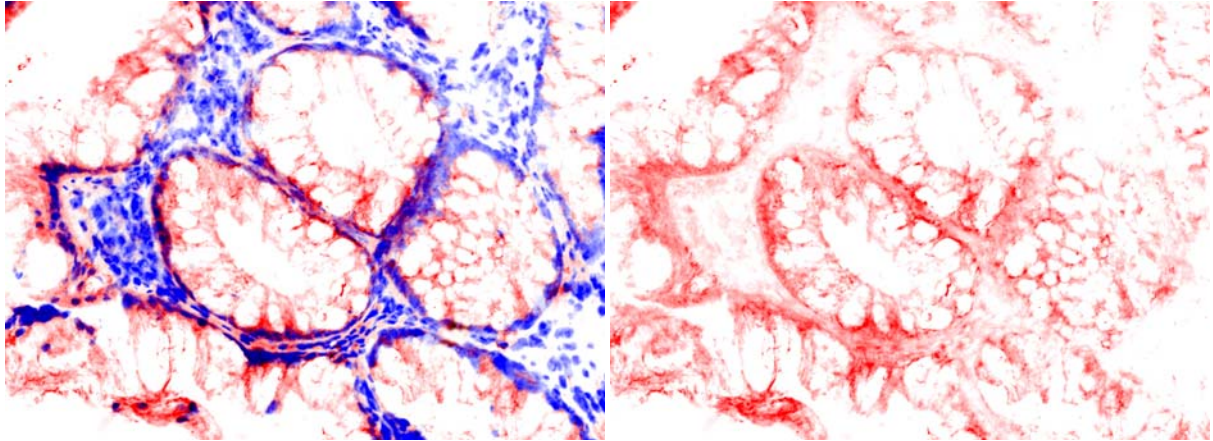


Abb. 4-68.a. Probe Nr. 566 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

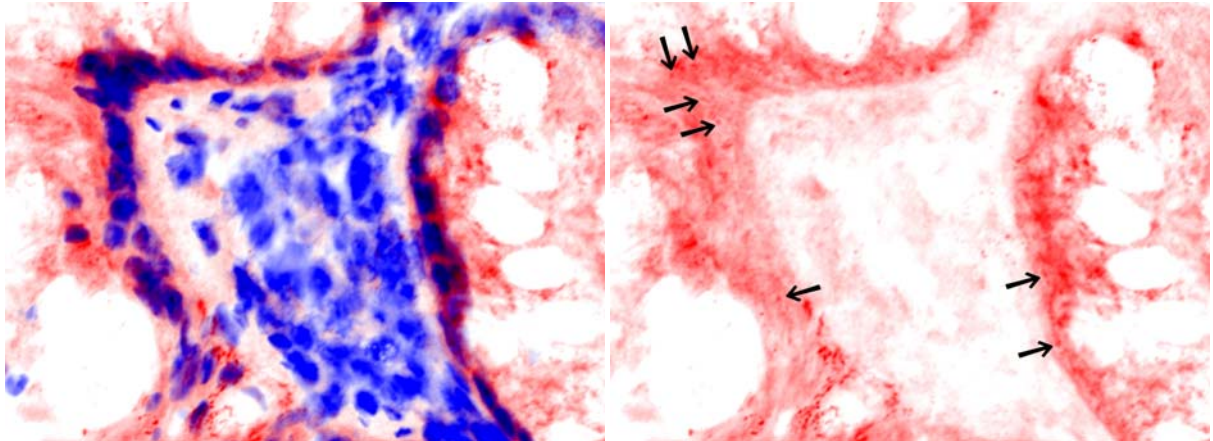


Abb. 4-68.b. Probe Nr. 566 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-68.a. IF-Färbung von Survivin.

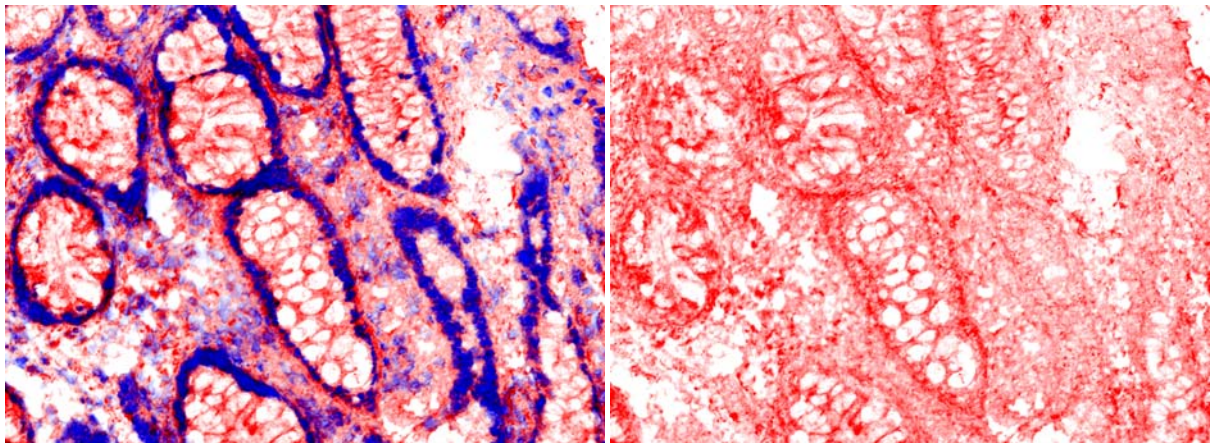


Abb. 4-69.a. Probe Nr. 595 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

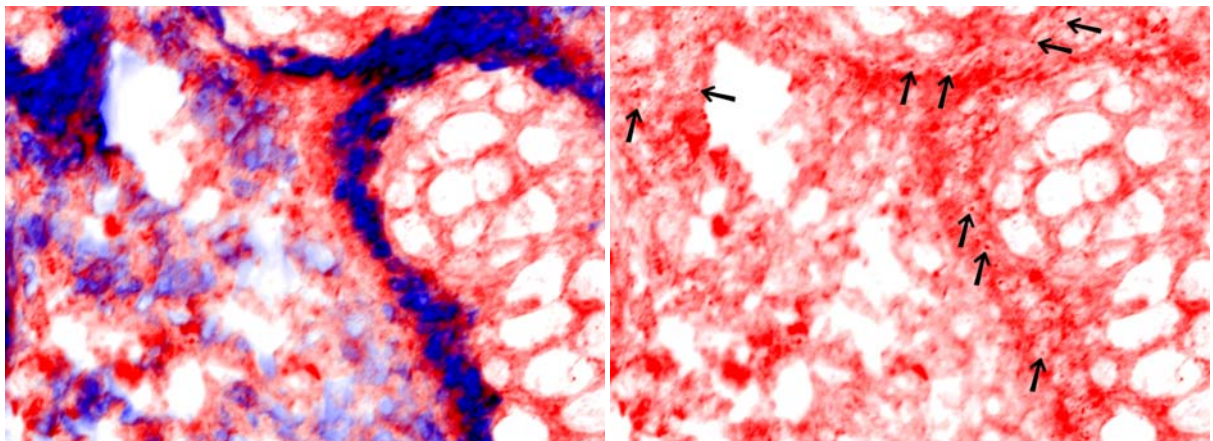


Abb. 4-69.b. Probe Nr. 595 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-69.a. IF-Färbung von Survivin.

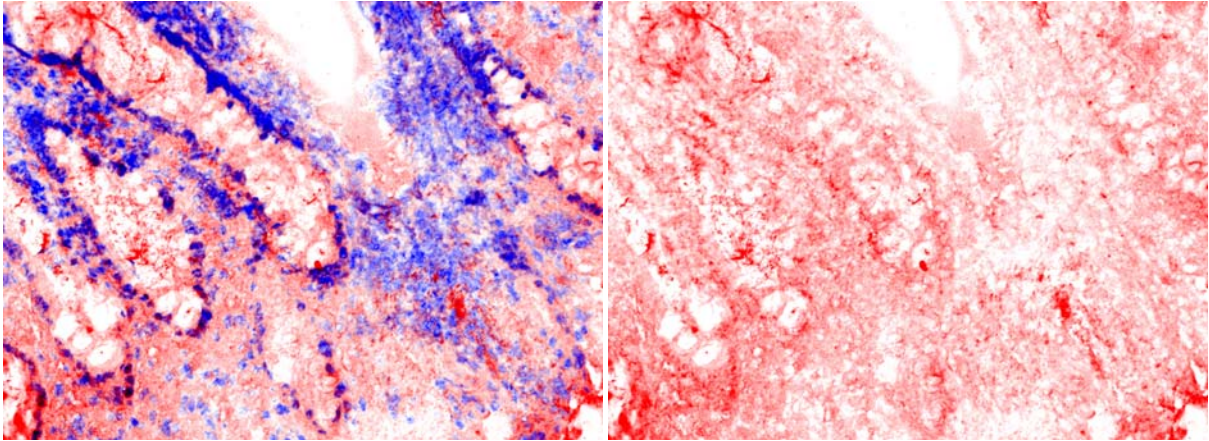


Abb. 4-70.a. Probe Nr. 574 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

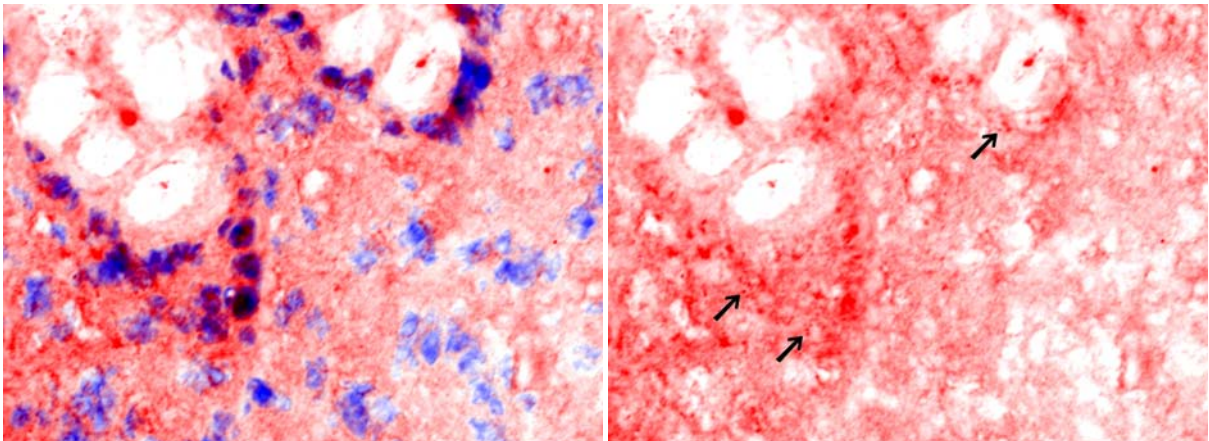


Abb. 4-70.b. Probe Nr. 574 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-70.a. IF-Färbung von Survivin.

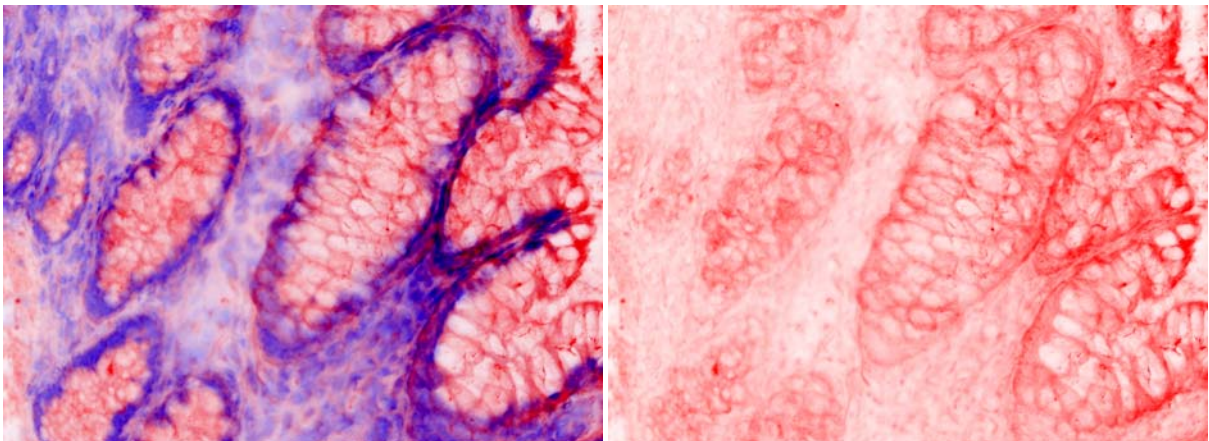


Abb. 4-71.a. Probe Nr. 608 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

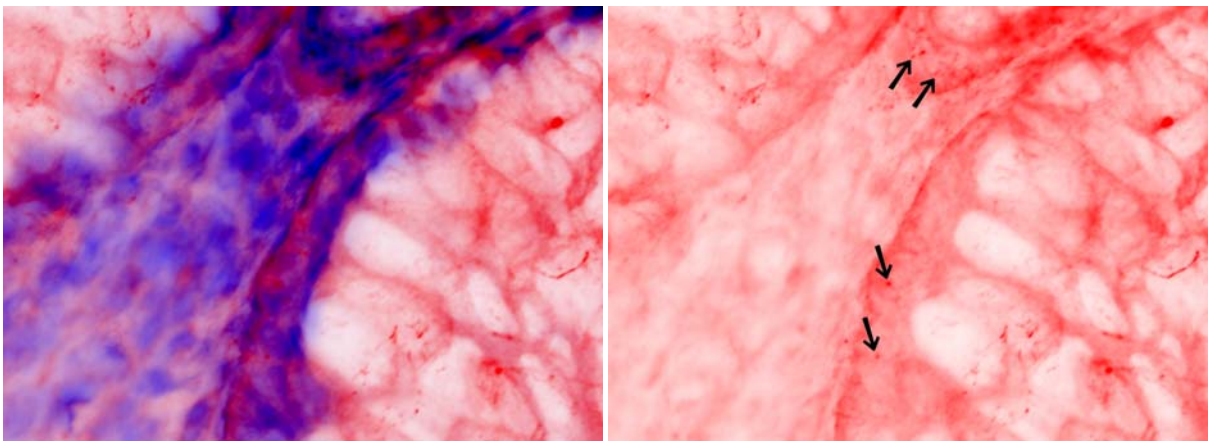


Abb. 4-71.b. Probe Nr. 608 CU, Pseudopolyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-71.a.

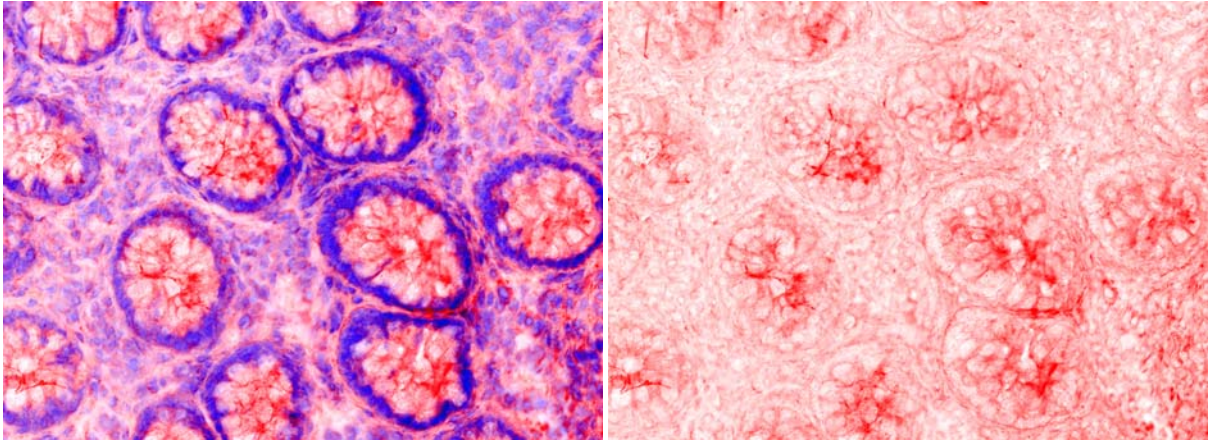


Abb. 4-72.a. Probe Nr. 610 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

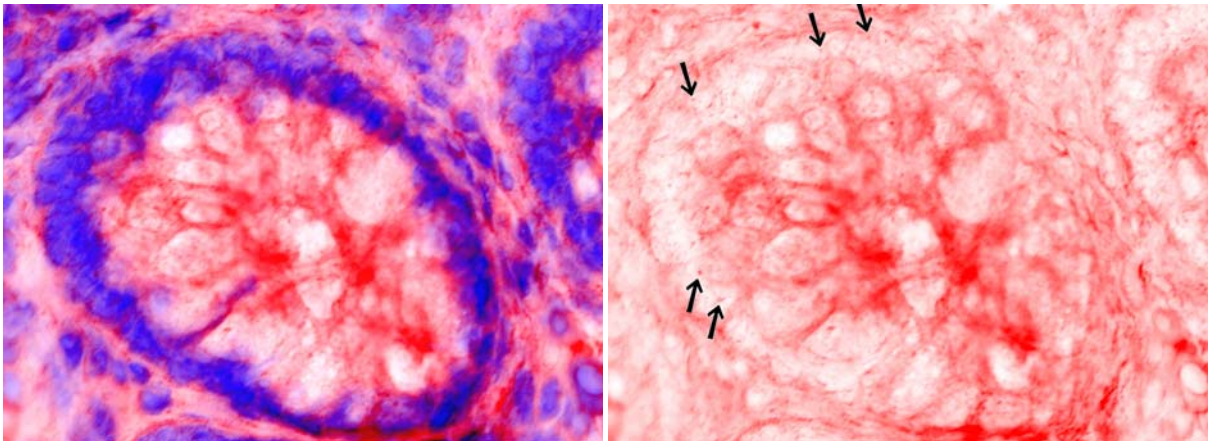


Abb. 4-72.b. Probe Nr. 610 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-72.a. IF-Färbung von Survivin.

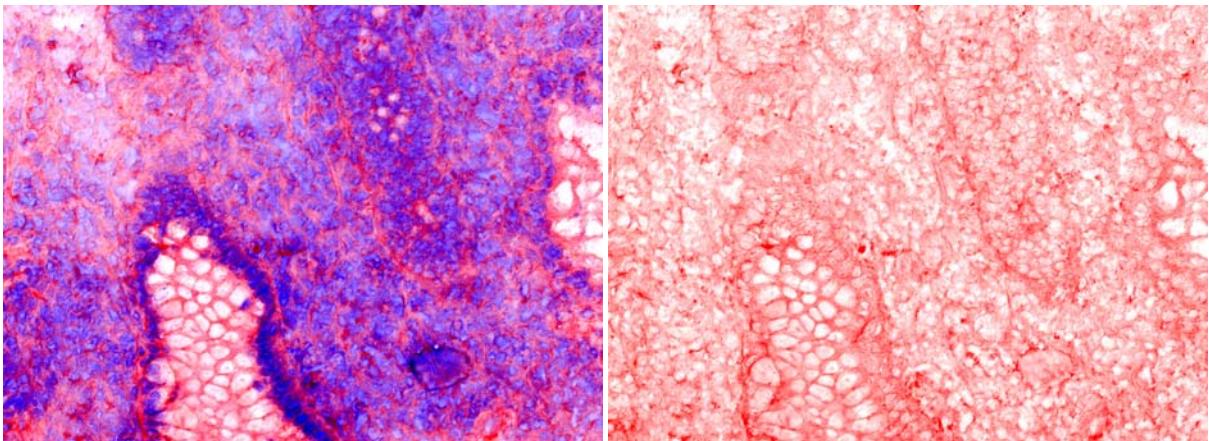


Abb. 4-73.a. Probe Nr. 552 CED (CU oder MC). Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

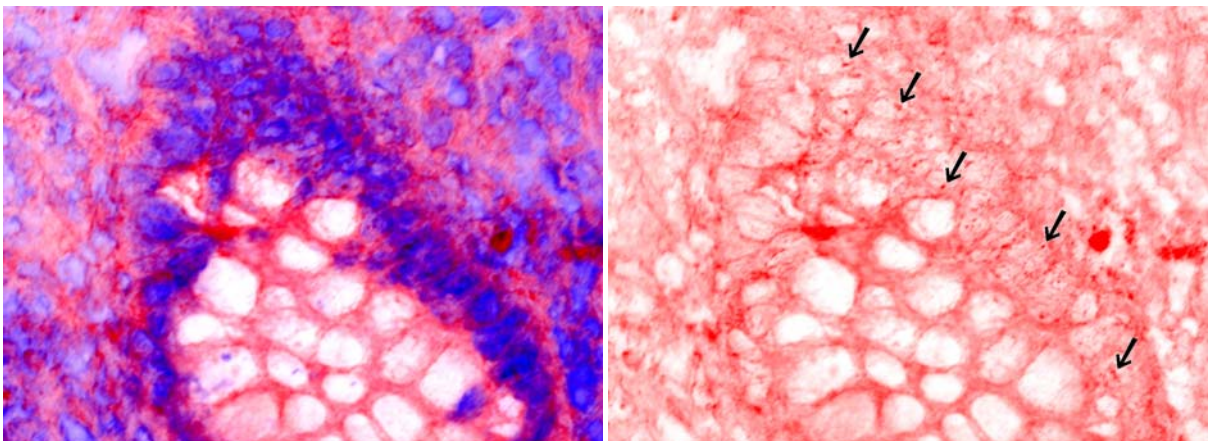


Abb. 4-73.b. Probe Nr. 552 CED (CU oder MC). Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-73.a.

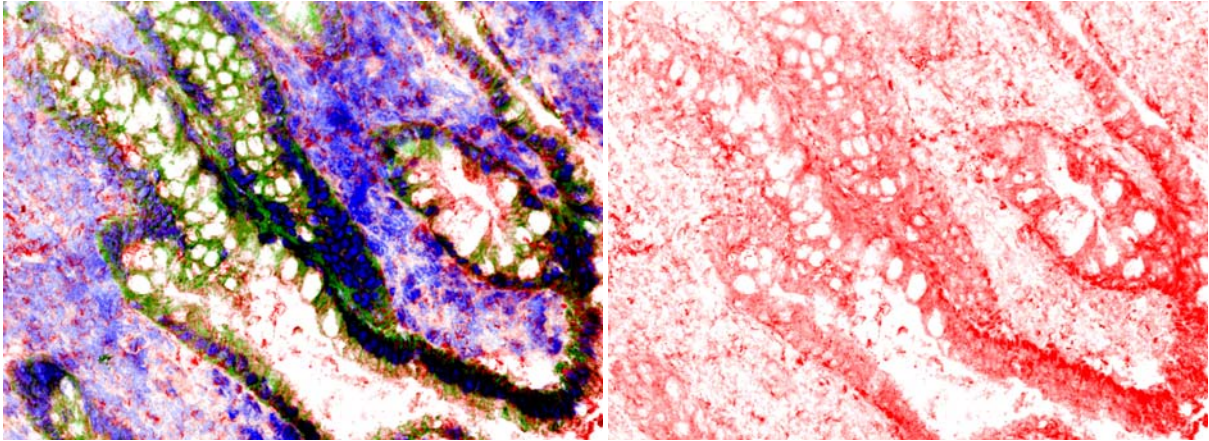


Abb. 4-74.a. Probe Nr. 524 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

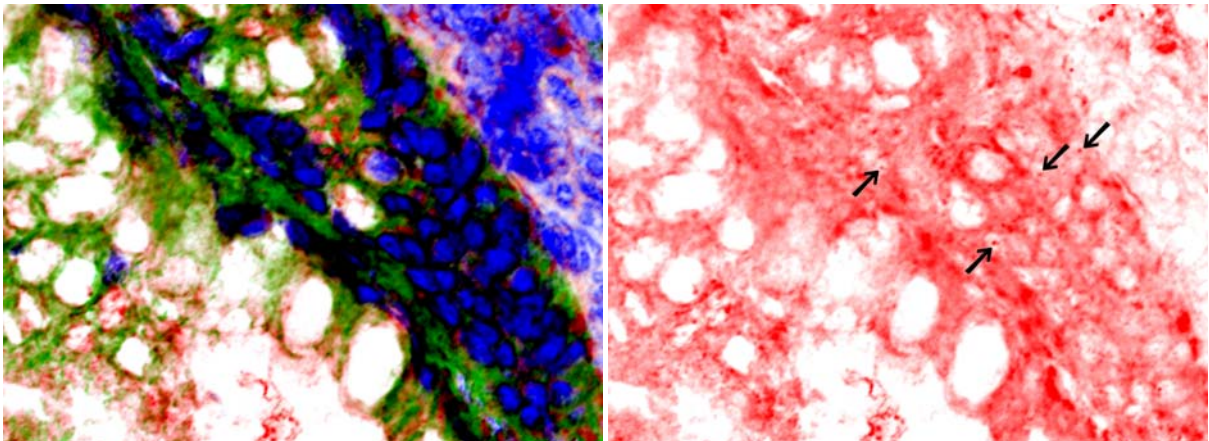


Abb. 4-74.b. Probe Nr. 524 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-74.a. IF-Färbung von Survivin.

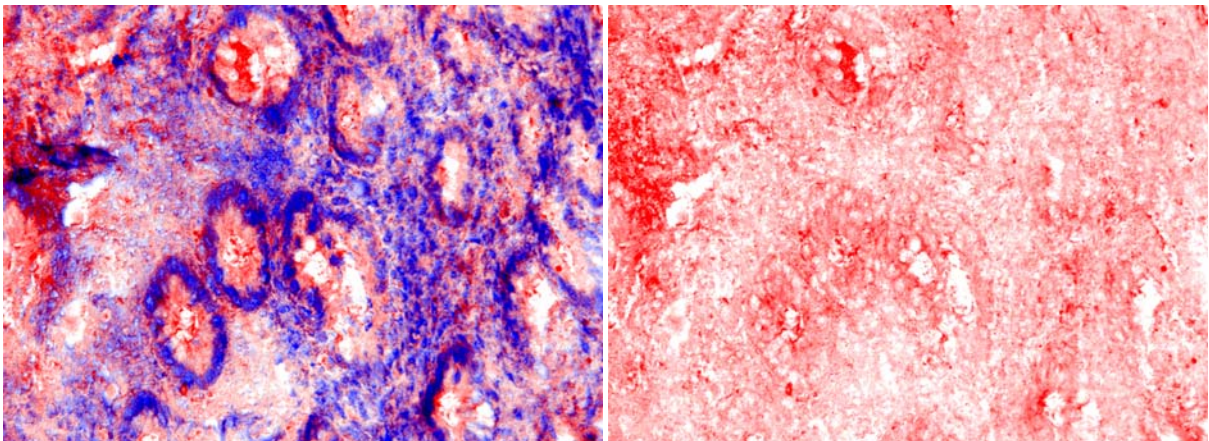


Abb. 4-75.a. Probe Nr. 571 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

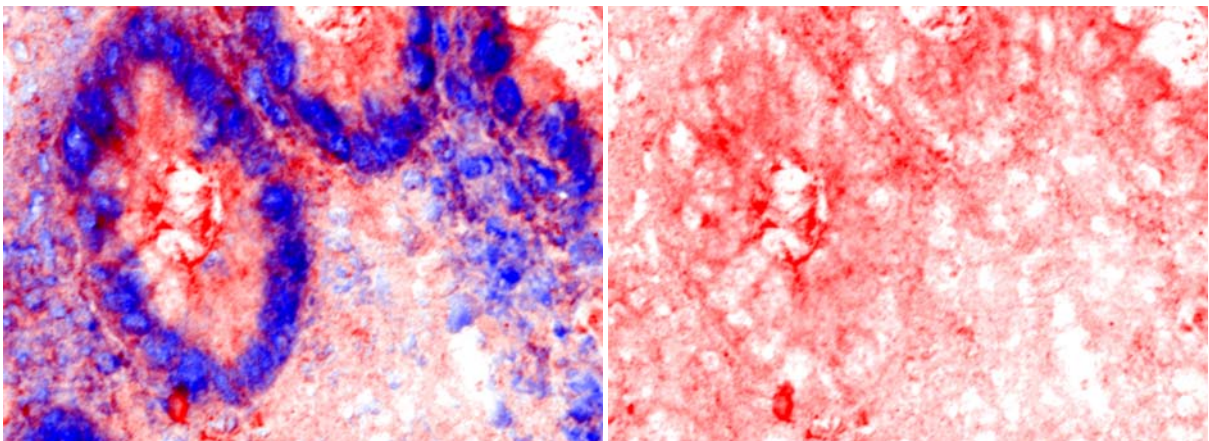


Abb. 4-75.b. Probe Nr. 571 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-75.a. IF-Färbung von Survivin.

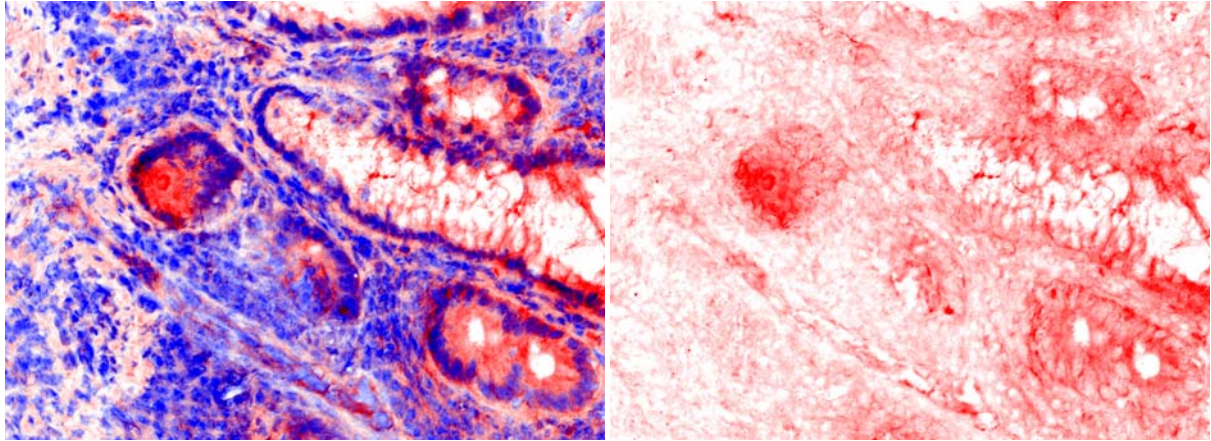


Abb. 4-76.a. Probe Nr. 562 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

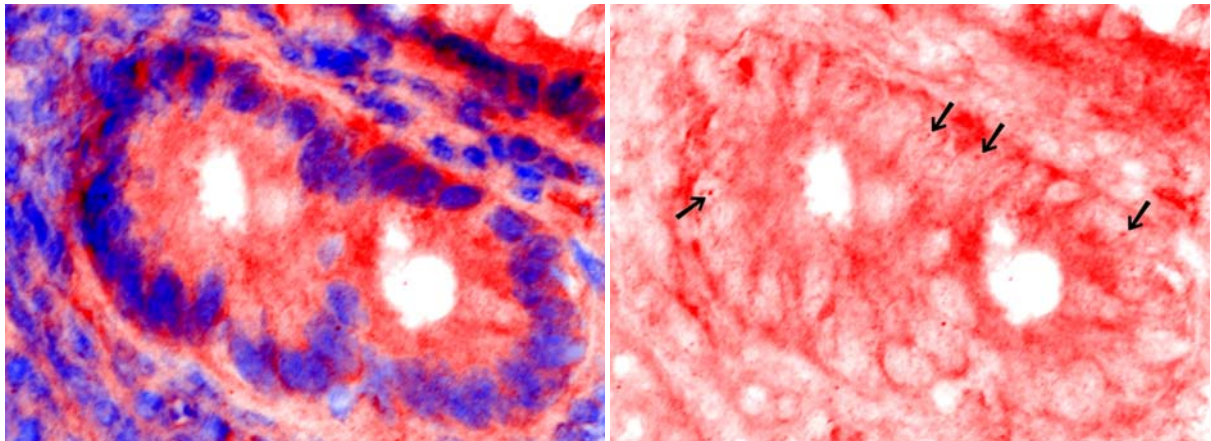


Abb. 4-76.b. Probe Nr. 562 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-76.a. IF-Färbung von Survivin.

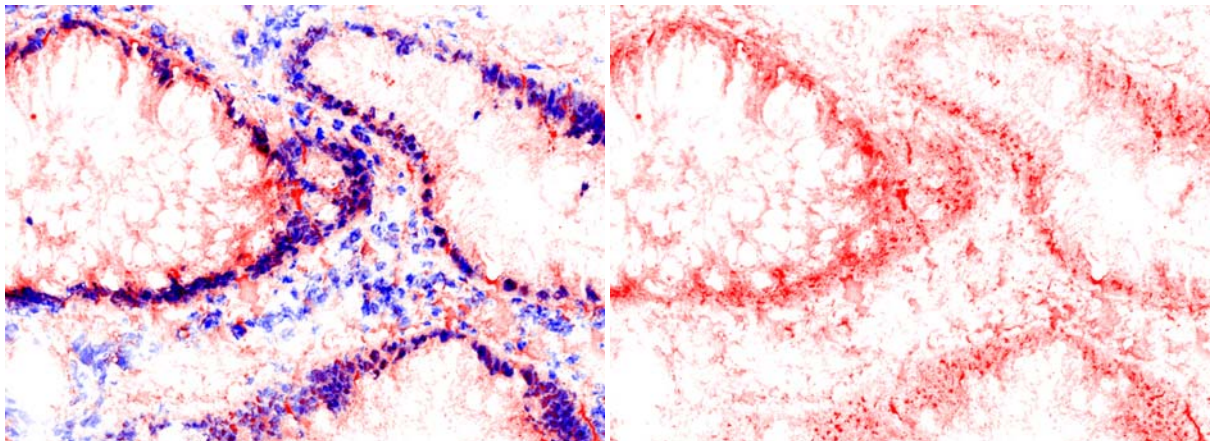


Abb. 4-77.a. Probe Nr. 583 CU, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

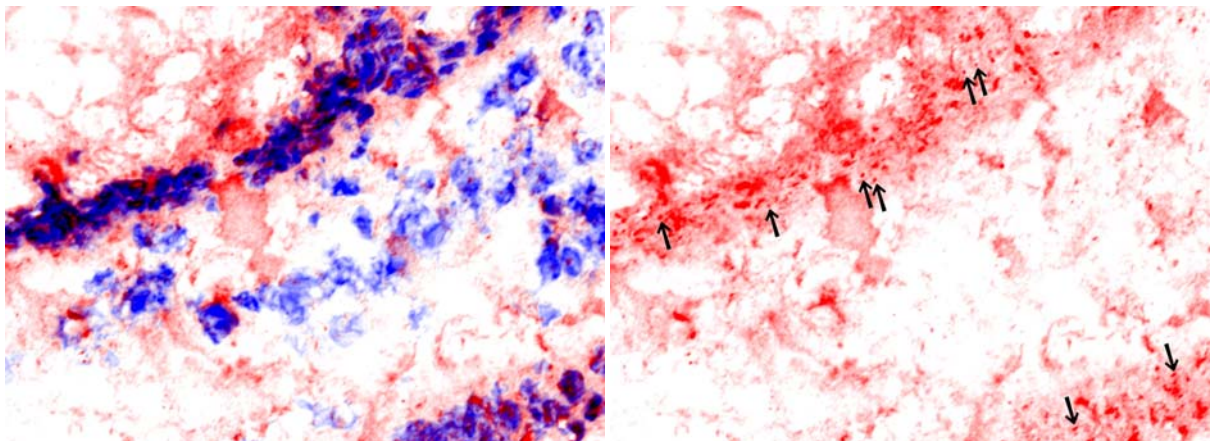


Abb. 4-77.b. Probe Nr. 583 CU, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-77.a. IF-Färbung von Survivin.

Survivinfärbung im Zellkern und starke Färbung im Cytoplasma (Abb. 4-78 bis Abb. 4-81):

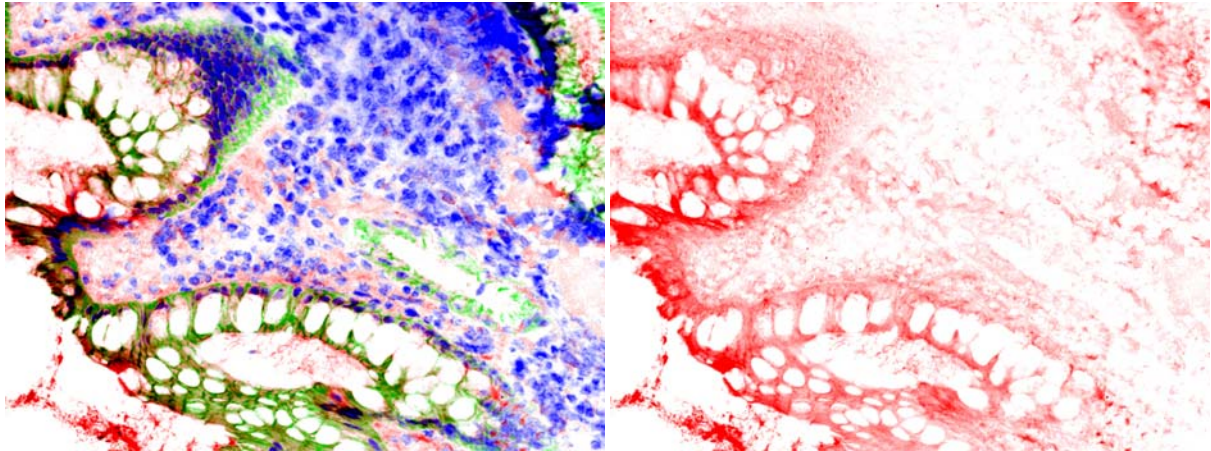


Abb. 4-78.a. Probe Nr. 586 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

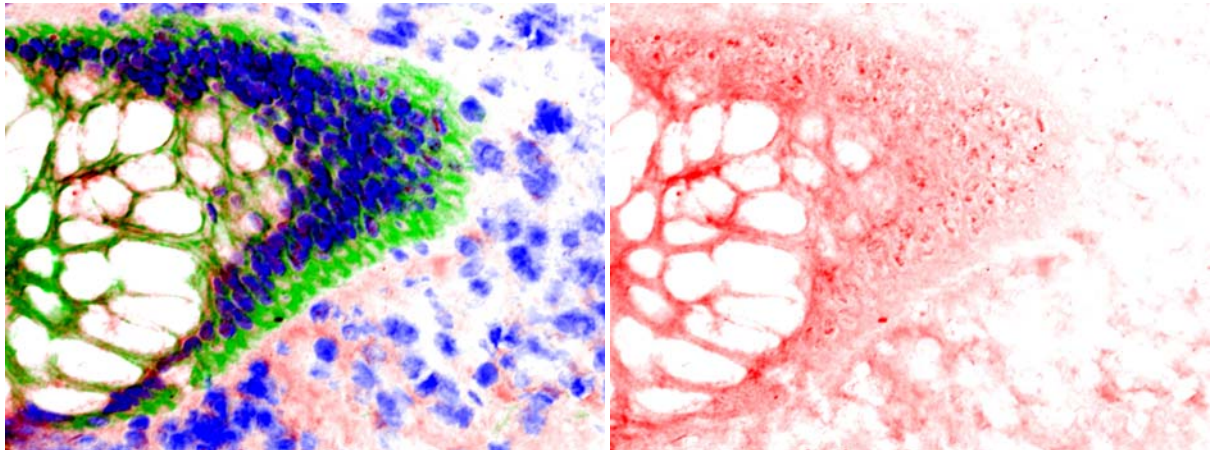


Abb. 4-78.b. Probe Nr. 586 CU, Pseudopolyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-78.a.

Abb. 4-78: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Pseudopolypgewebe eines CU-Patienten. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt. Es gibt Survivinfärbung im Zellkern und starke cytoplasmatische Survivinfärbung der Kryptenepithelzellen.

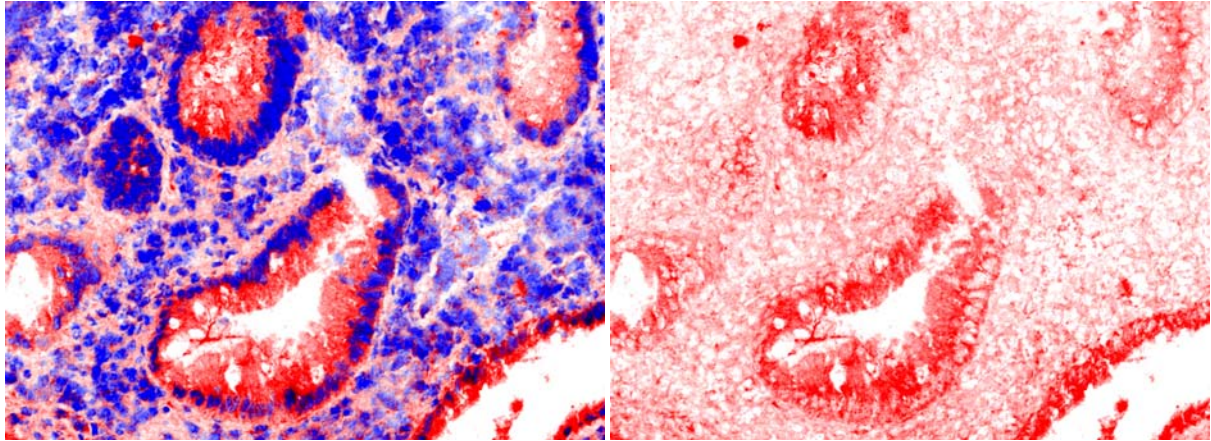


Abb. 4-79.a. Probe Nr. 523 CU, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

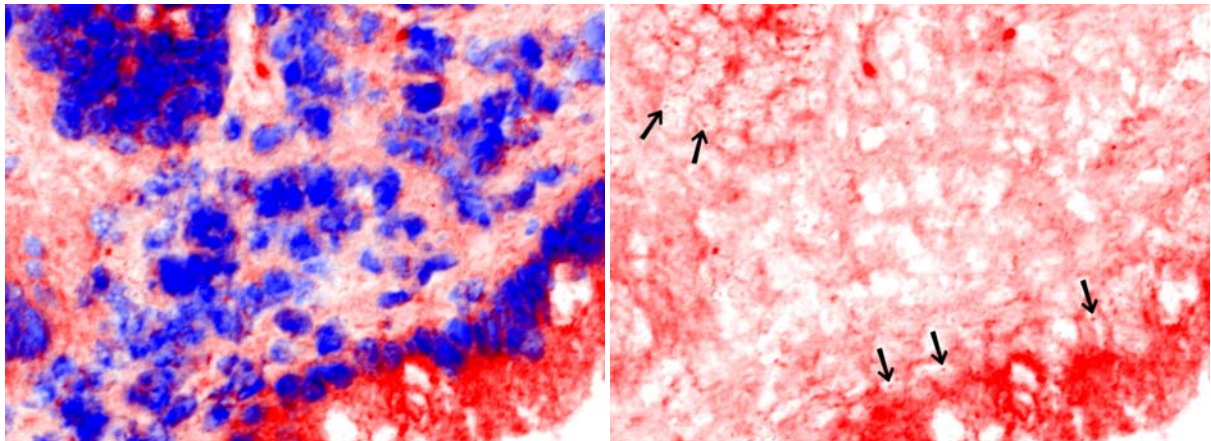


Abb. 4-79.b. Probe Nr. 523 CU, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-79.a.

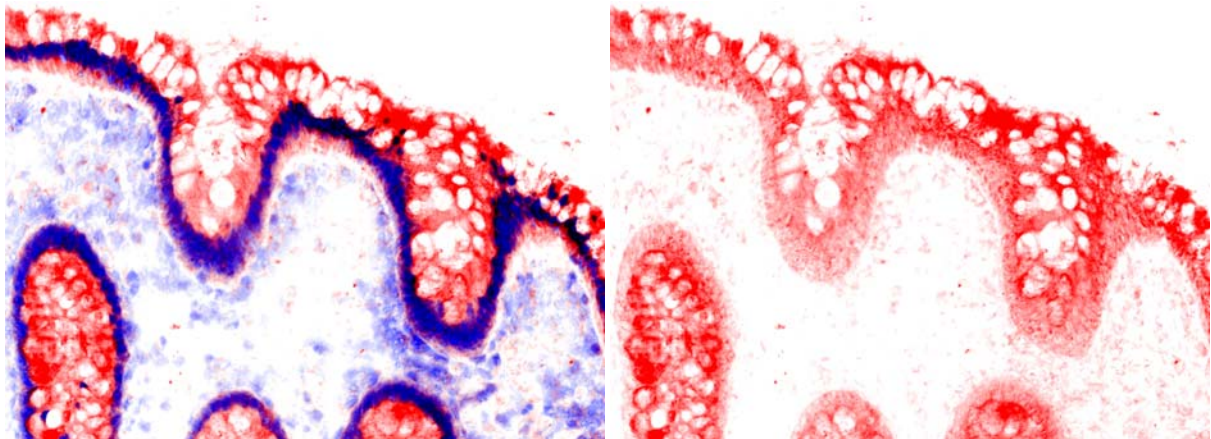


Abb. 4-80.a. Probe Nr. 584 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

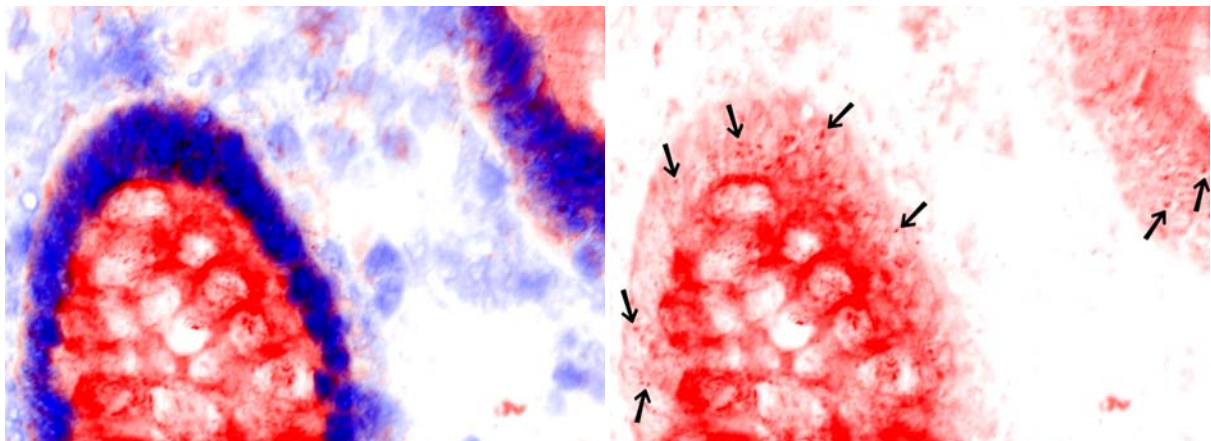


Abb. 4-80.b. Probe Nr. 584 CU, Pseudopolyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-80.a.

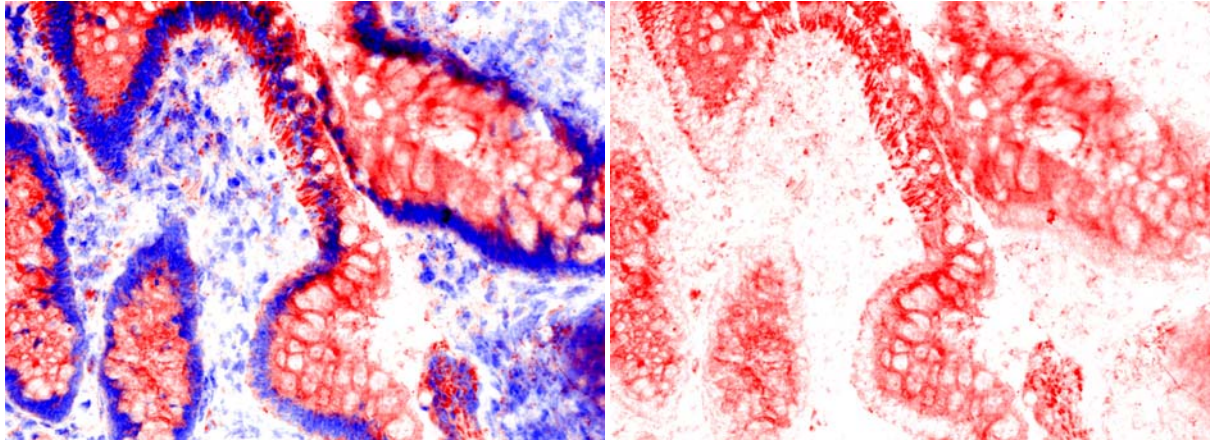


Abb. 4-81.a. Probe Nr. 474 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

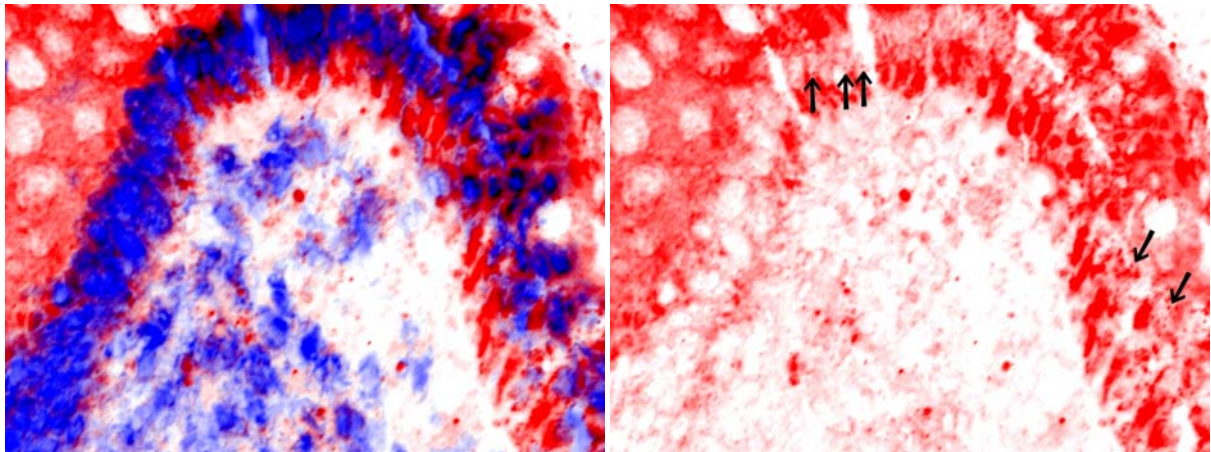


Abb. 4-81.b. Probe Nr. 474 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-81.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-81: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Gewebe eines CU-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt. Es gibt Survivinfärbung im Zellkern und starke cytoplasmatische Survivinfärbung der Kryptenepithelzellen. Einige Zellkerne sind exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet.

Keine Survivin-färbung im Zellkern, aber Survivin-färbung im Cytoplasma (Abb. 4-82 bis Abb. 4-83):

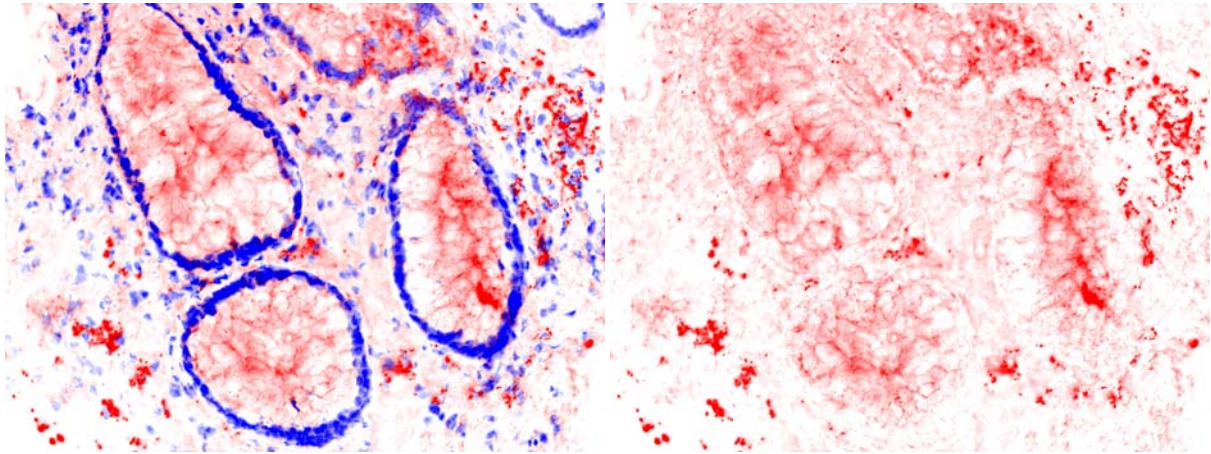


Abb. 4-82.a. Probe Nr. 544 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

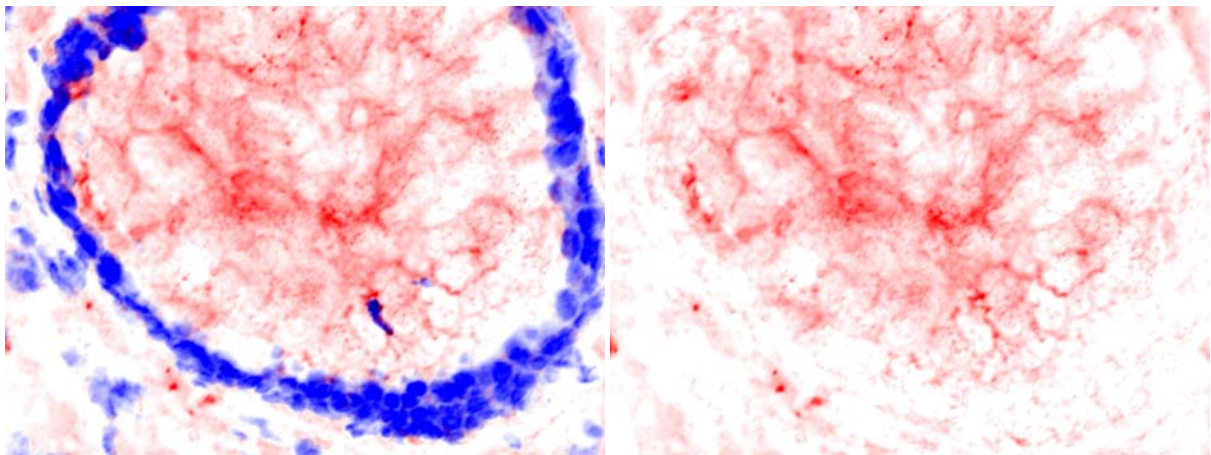


Abb. 4-82.b. Probe Nr. 544 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-82.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-82: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Gewebe eines CU-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Survivin-färbung ist dargestellt. Es gibt keine Survivin-färbung im Zellkern, aber cytoplasmatische Survivin-färbung der Kryptenepithelzellen.

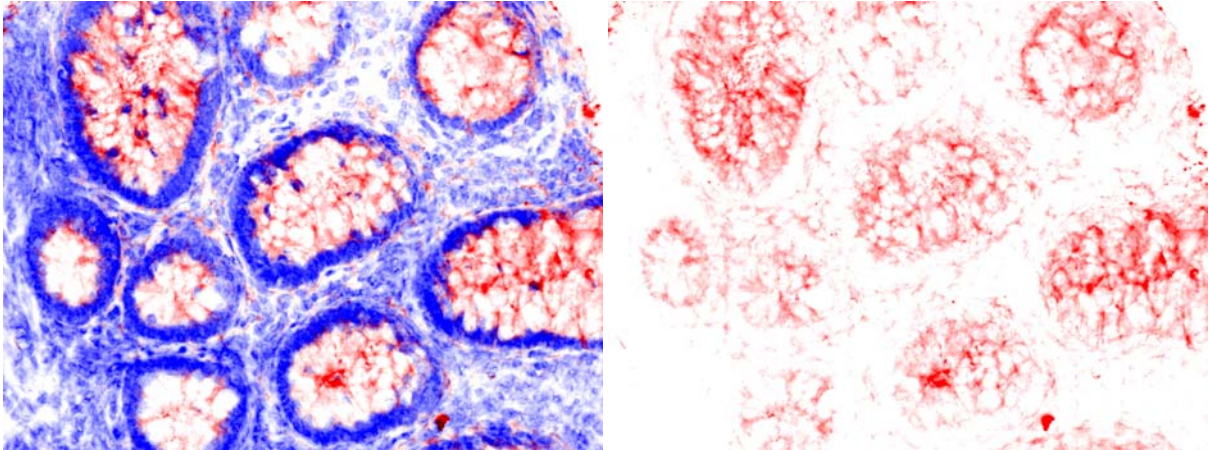


Abb. 4-83.a. Probe Nr. 577 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

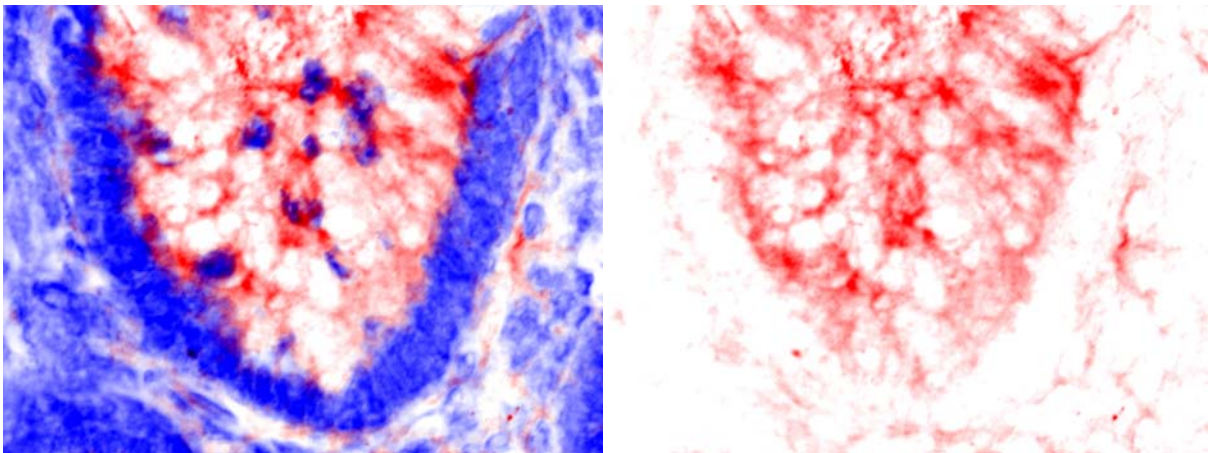


Abb. 4-83.b. Probe Nr. 577 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-83.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-83: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Gewebe eines CU-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Survivin färbung ist dargestellt. Es gibt keine Survivin färbung im Zellkern, aber cytoplasmatische Survivin färbung der Kryptenepithelzellen.

Keine Survivinfärbung im Zellkern, aber starke Survivinfärbung im Cytoplasma (Abb. 4-84):

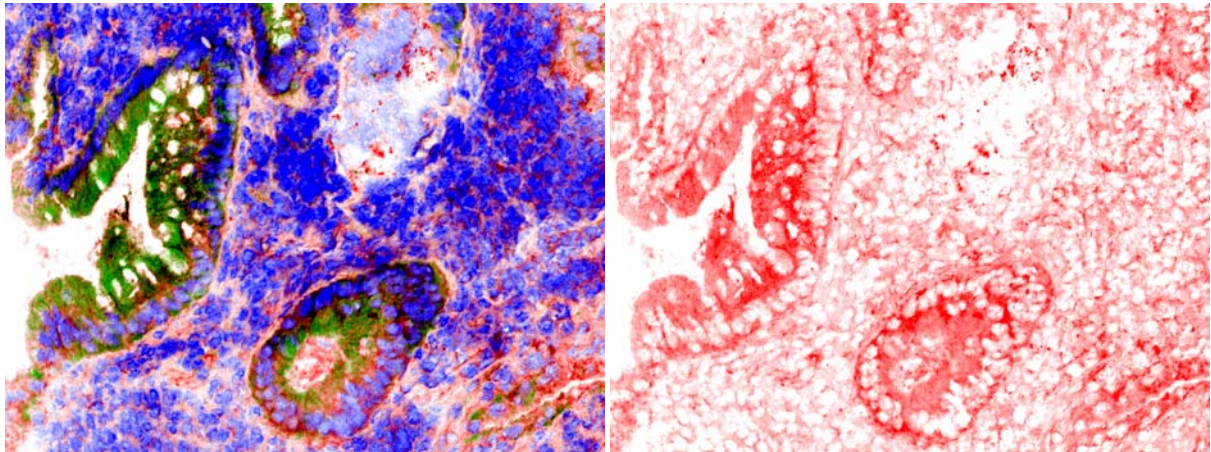


Abb. 4-84.a. Probe Nr. 522 CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

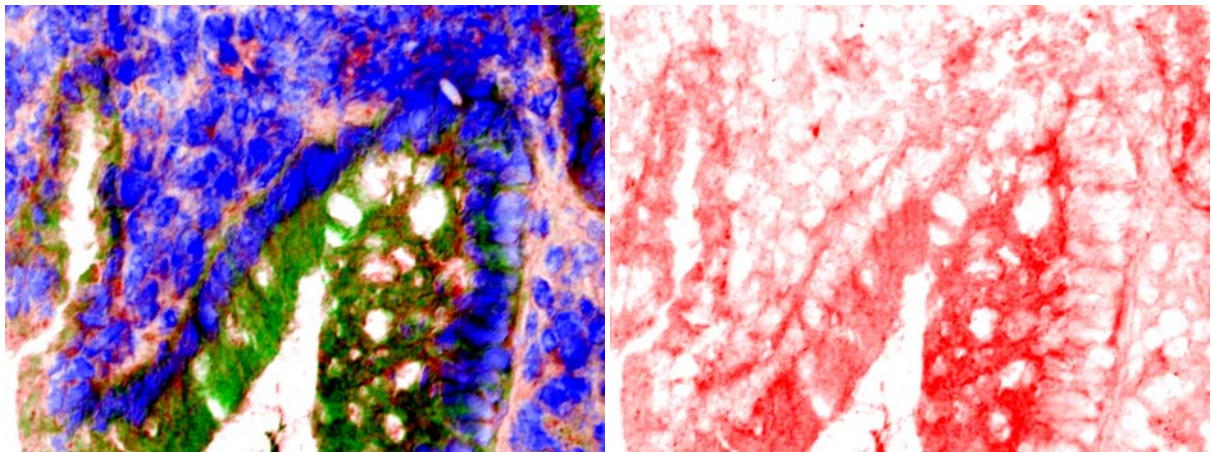


Abb. 4-84.b. Probe Nr. 522 CU. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-84.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-84: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Gewebe eines CU-Patienten. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt. Es gibt keine Survivinfärbung im Zellkern, aber starke cytoplasmatische Survivinfärbung der Kryptenepithelzellen.

Keine Survivinfärbung (Abb. 4-85 bis Abb. 4-86):

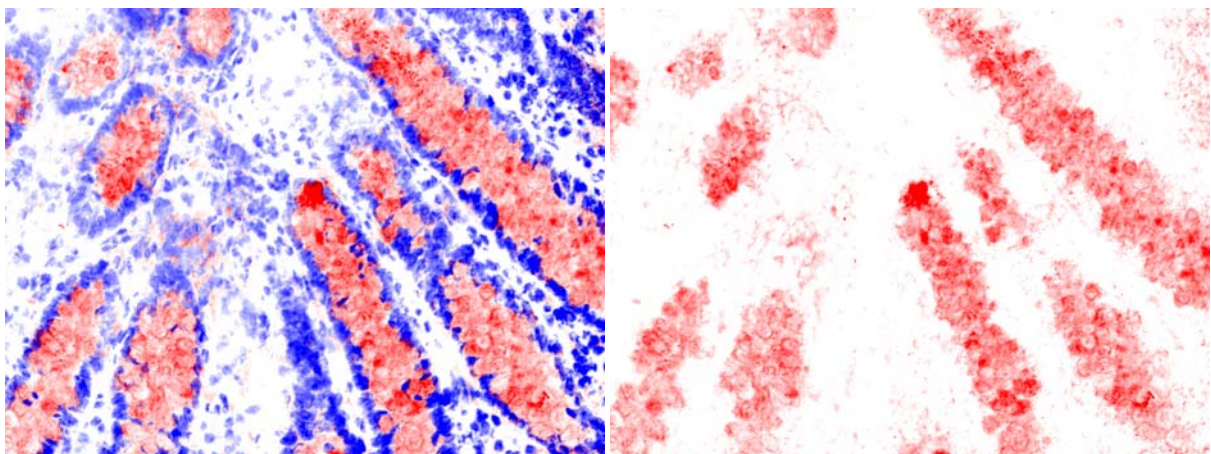


Abb. 4-85.a. Probe Nr. 475 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x.

Abb. 4-85: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Gewebe eines CU-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt. Keine Survivinfärbung. Das Signal ist eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Schleim der Becherzellen (siehe auch Negativkontrolle Abb. 4-85.b).

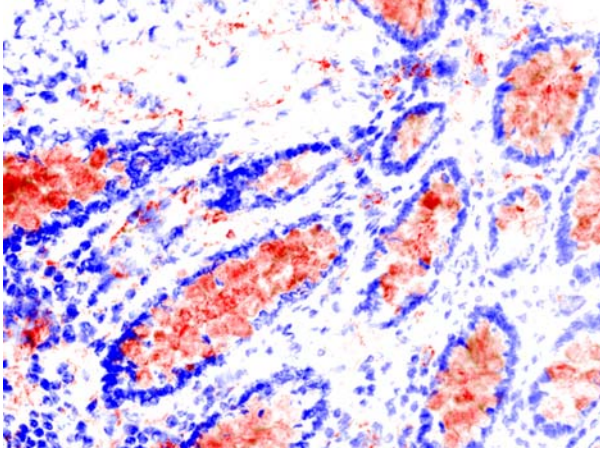


Abb. 4-85.b. Probe Nr. 475 CU, Pseudopolyp, Negativkontrolle. Originalvergrößerung 200 x.

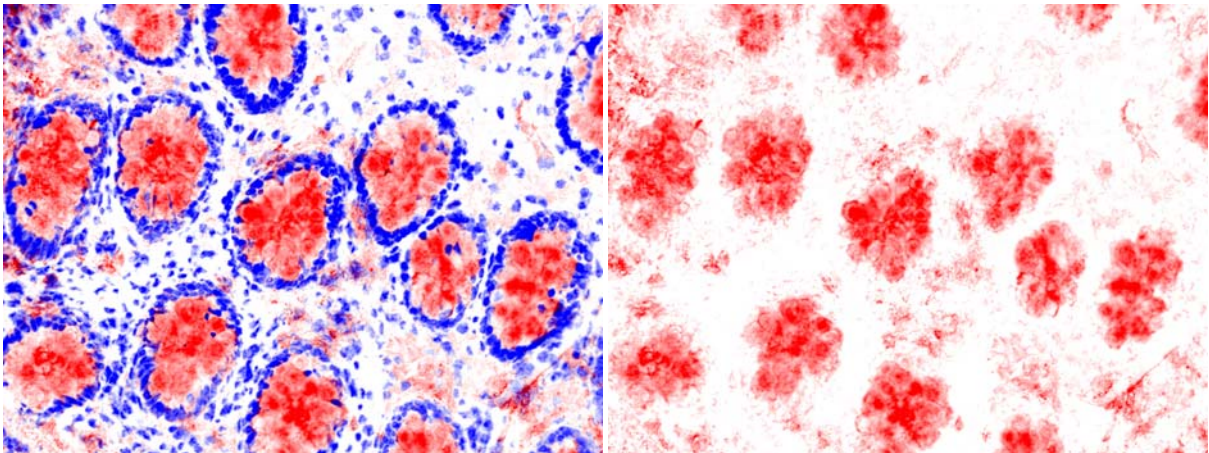


Abb. 4-86.a. Probe Nr. 536 CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x.

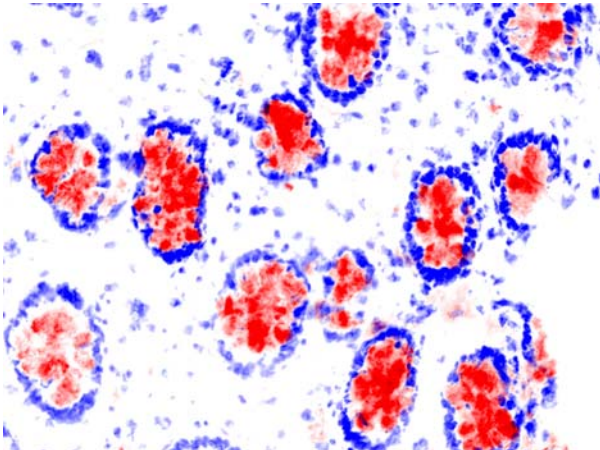


Abb. 4-86.b. Probe Nr. 536 CU, Pseudopolyp, Negativkontrolle. Originalvergrößerung 200 x.

Abb. 4-67 bis Abb. 4-86:

Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Gewebe von CED-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. 4-67 bis 4-77: Proben mit Survivin-färbung im Zellkern und im Cytoplasma.

Abb. 4-78 bis 4-81: Proben mit Survivin-färbung im Zellkern und starker Färbung im Cytoplasma.

Abb. 4-82 bis 4-83: Keine Survivin-färbung im Zellkern, aber Färbung im Cytoplasma.

Abb. 4-84: Keine Survivin-färbung im Zellkern, aber starke Färbung im Cytoplasma.

Abb. 4-85 bis 4-86: Keine Survivin-färbung. Die unspezifische Färbung ist auch in den Negativkontrollen vorhanden und wird wahrscheinlich hervorgerufen durch eine unspezifische Bindung der Antikörper an den Schleim der Becherzellen.

Abb. 4-74, 4-78 und 4-84, links: Doppelfärbung mit β -Catenin (grün).

Abb. 4-67 bis 4-86, rechts: Nur Survivin-färbung ist dargestellt.

Bei den zehn **Polyproben von Menschen ohne CED** haben 90% der Proben Survivin-färbung im Zellkern und im Cytoplasma (Abb. 4-87 bis Abb. 4-95). 10% zeigen keine Survivin-färbung (Abb. 4-96).

Survivinfärbung im Zellkern und im Cytoplasma (Abb. 4-87 bis Abb. 4-95):

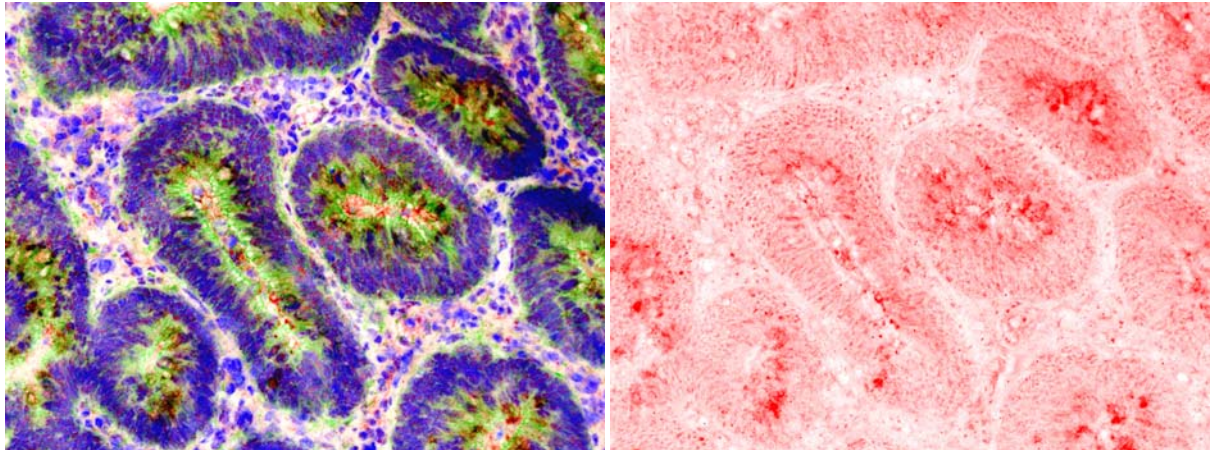


Abb. 4-87.a. Probe Nr. 603, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

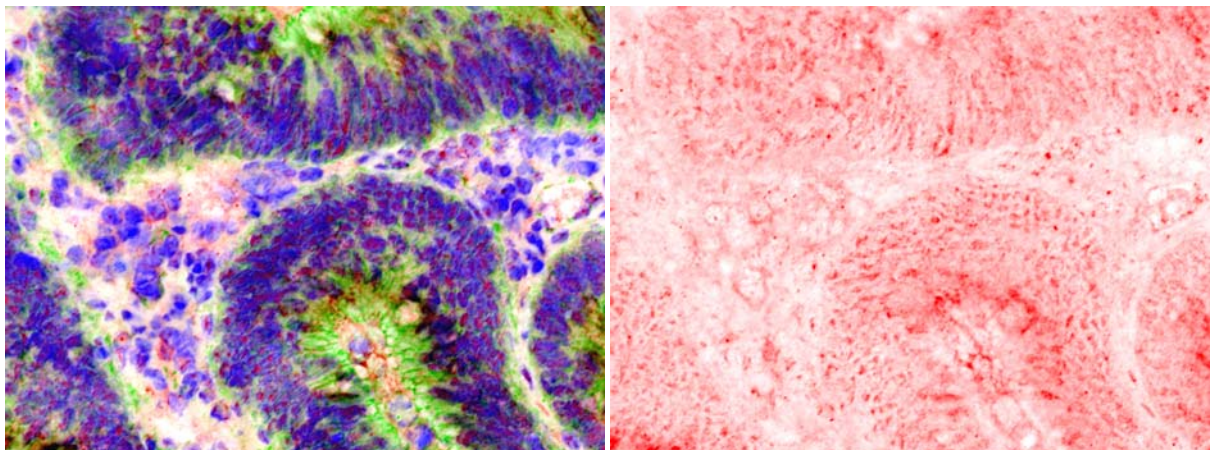


Abb. 4-87.b. Probe Nr. 603, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-87.a. IF-Färbung von Survivin.

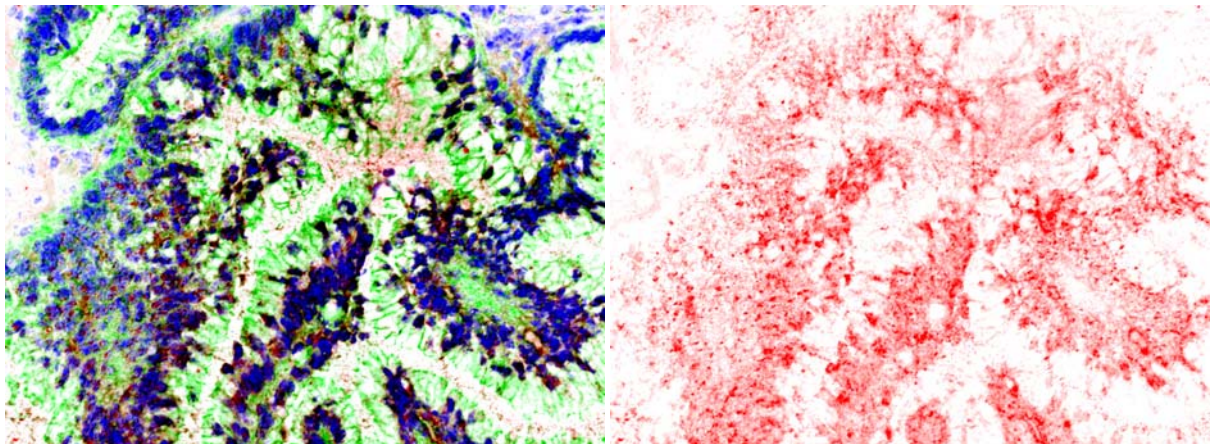


Abb. 4-88. Probe Nr. 598, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-87 bis 4-88: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Polypgewebe von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.
Abb. rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt. Es gibt deutliche Survivinfärbung im Zellkern und außerdem Survivinfärbung im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen.

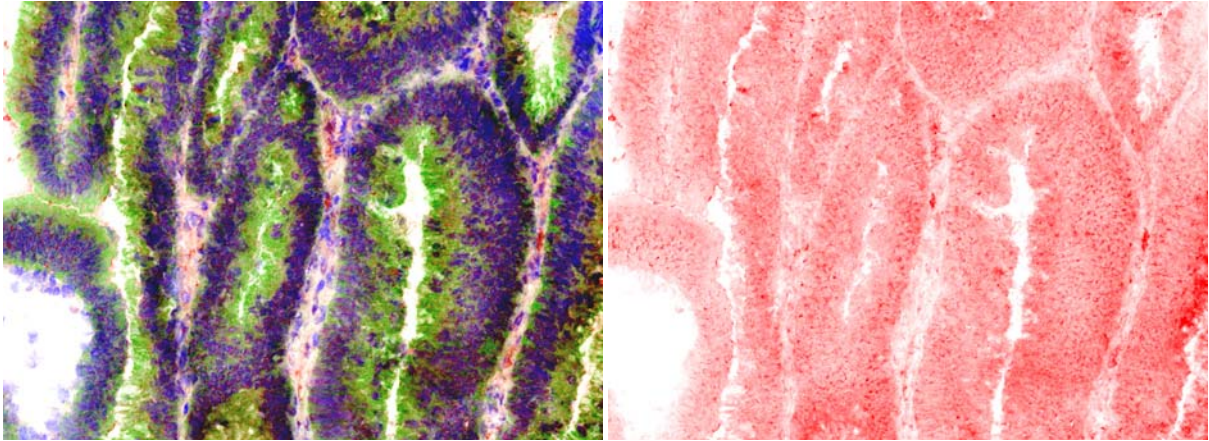


Abb. 4-89.a. Probe Nr. 615, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

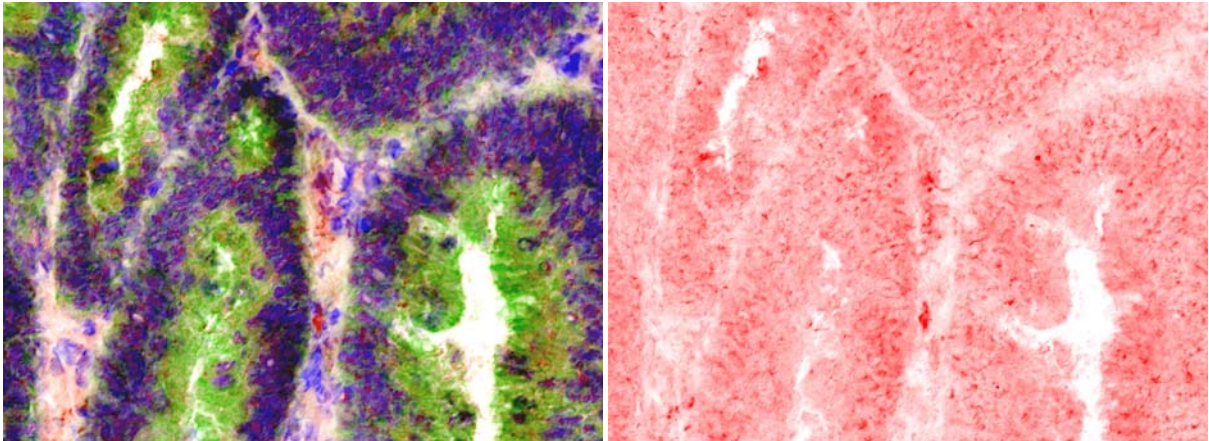


Abb. 4-89.b. Probe Nr. 615, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-89.a. IF-Färbung von Survivin.

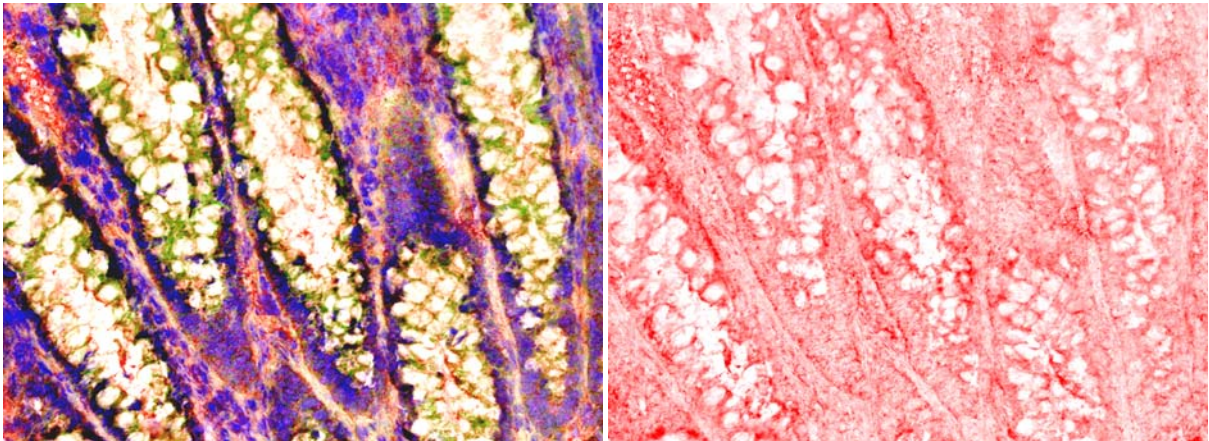


Abb. 4-90.a. Probe Nr. 618, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

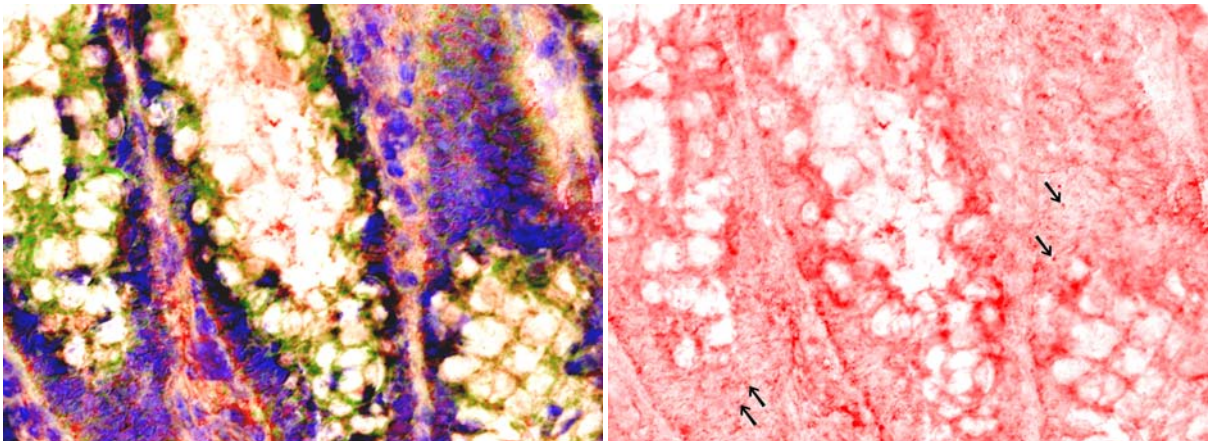


Abb. 4-90.b. Probe Nr. 618, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-90.a. IF-Färbung von Survivin.

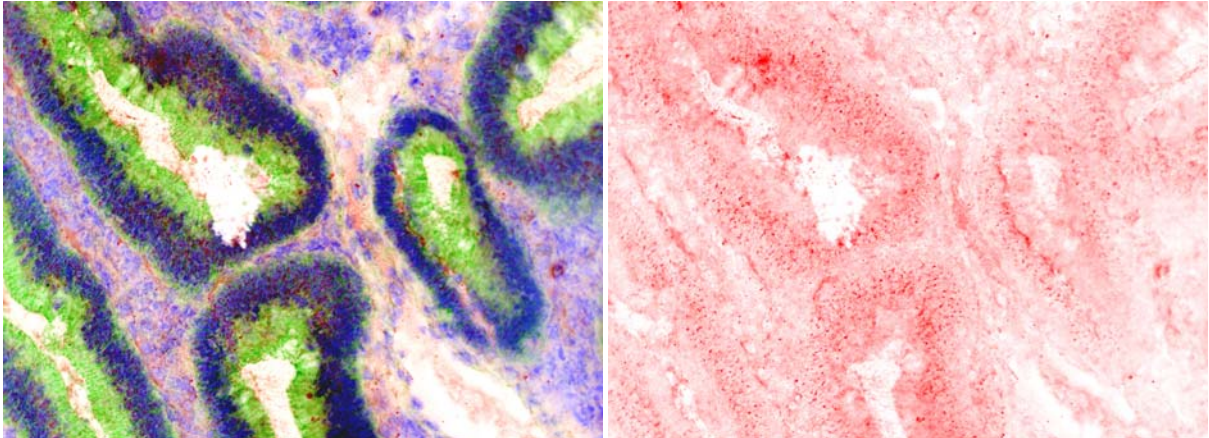


Abb. 4-91.a. Probe Nr. 568, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

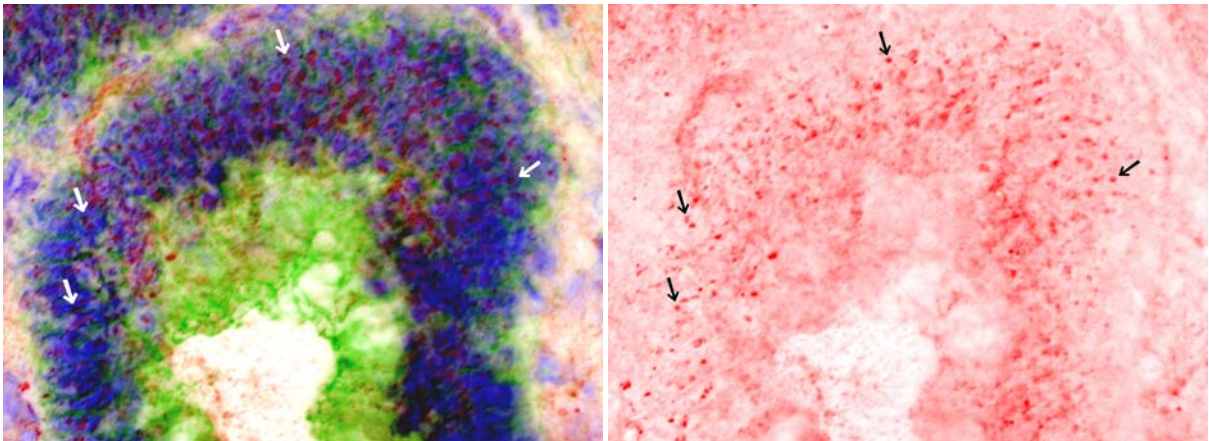


Abb. 4-91.b. Probe Nr. 568, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-91.a. IF-Färbung von Survivin.

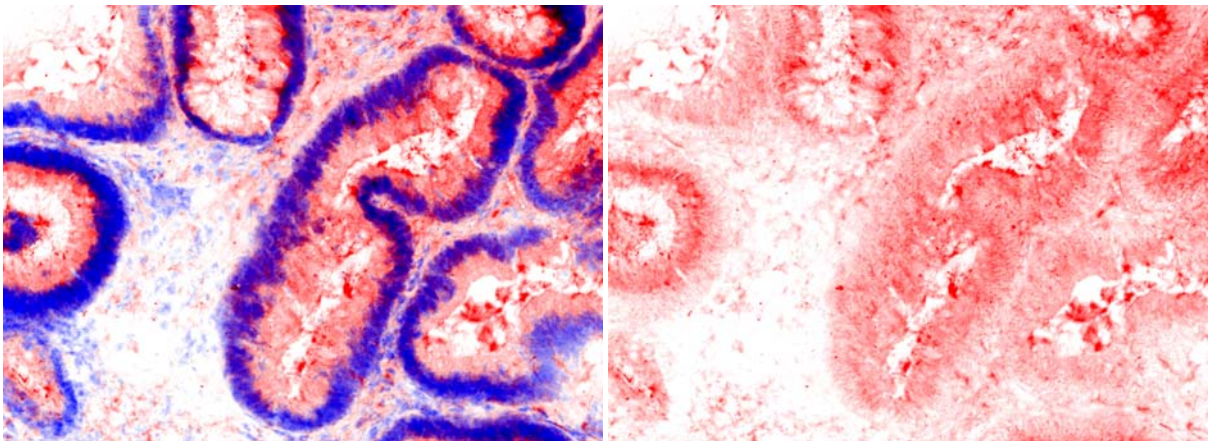


Abb. 4-92.a. Probe Nr. 521, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

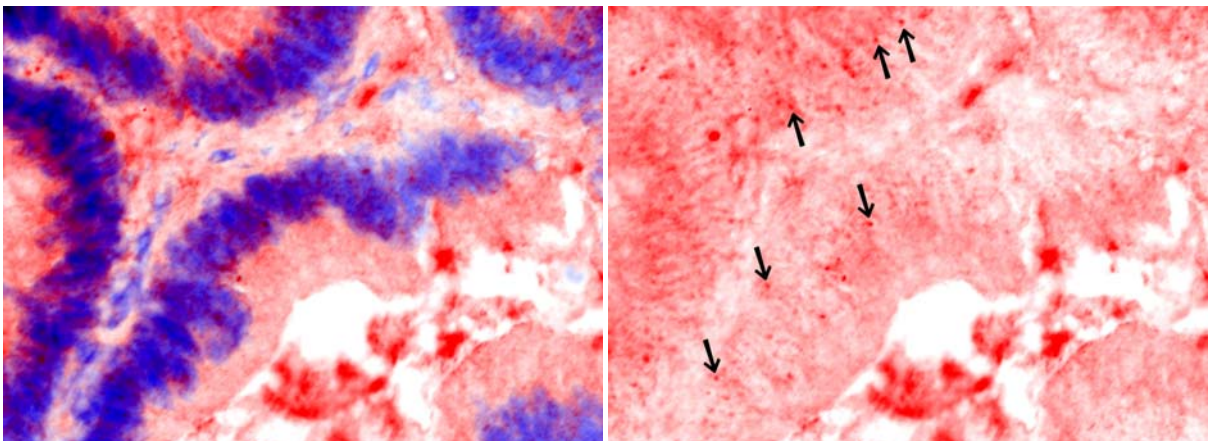


Abb. 4-92.b. Probe Nr. 521, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-92.a. IF-Färbung von Survivin.

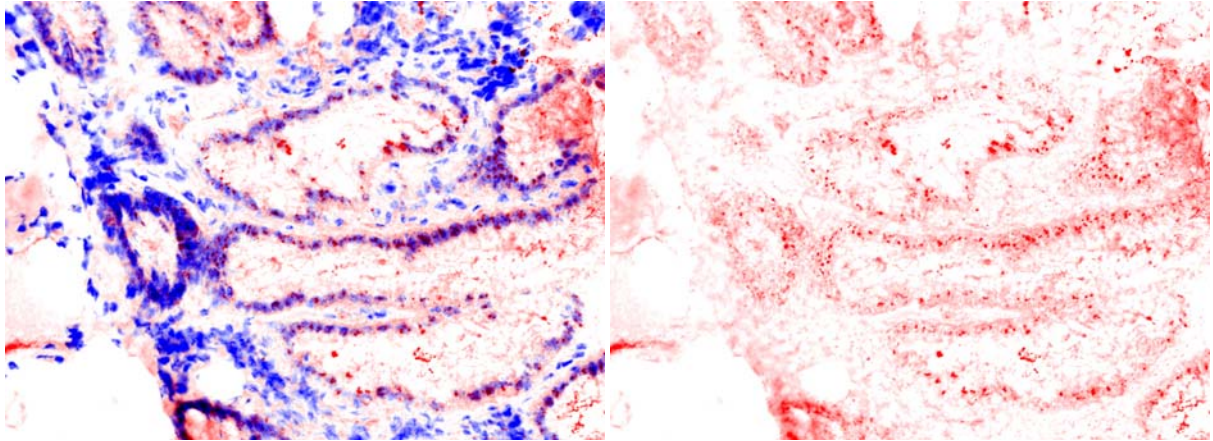


Abb. 4-93. Probe Nr. 596, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

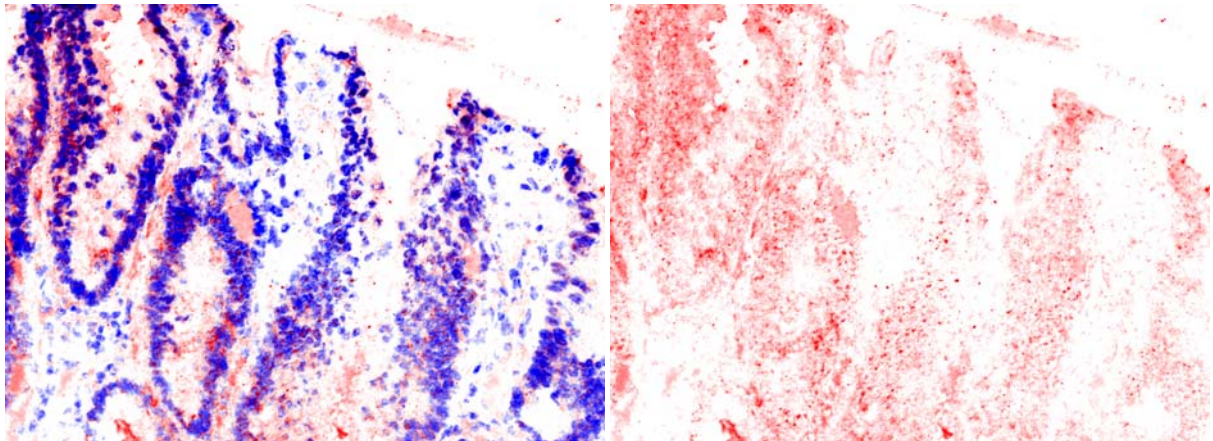


Abb. 4-94. Probe Nr. 546, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

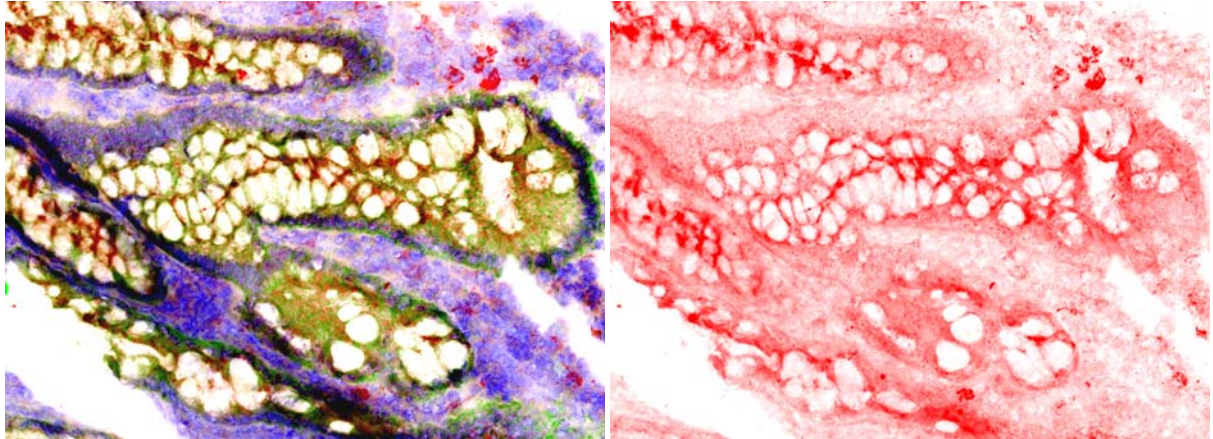


Abb. 4-95.a. Probe Nr. 613, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

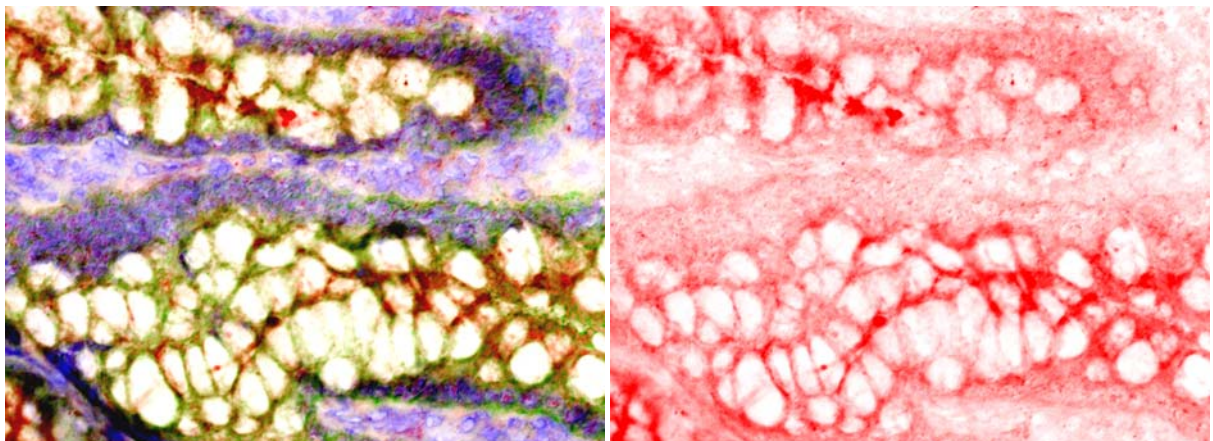


Abb. 4-95.b. Probe Nr. 613, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-95.a. IF-Färbung von Survivin.

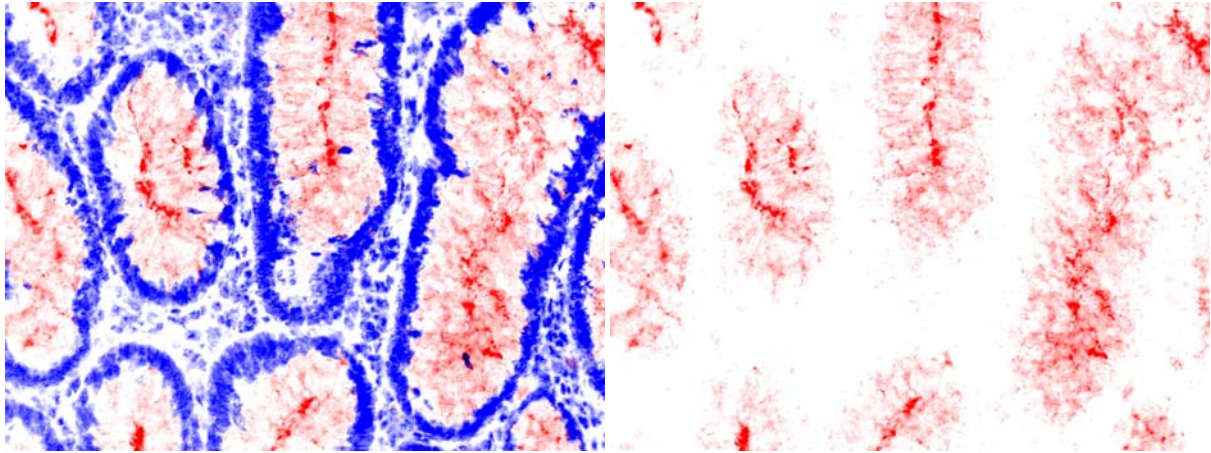
Keine Survivinfrbung (Abb. 4-96):

Abb. 4-96.a. Probe Nr. 553, Polyp. Originalvergrößerung 200 x.

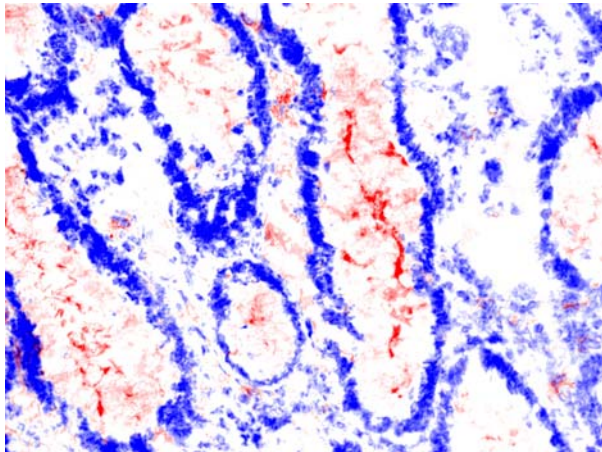


Abb. 4-96.b. Probe Nr. 553, Polyp, Negativkontrolle. Originalvergrößerung 200 x.

Abb. 4-87 bis Abb. 4-96:

Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Polypgewebe von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. 4-87 bis 4-95: Proben mit Survivinfrbung im Zellkern und im Cytoplasma.

Abb. 4-96: Keine Survivinfrbung. Die unspezifische Färbung ist auch in der Negativkontrolle vorhanden und wird wahrscheinlich hervorgerufen durch eine unspezifische Bindung der Antikörper an den Schleim der Becherzellen.

Abb. 4-87 bis 4-91 und Abb. 4-95, links: Doppelfärbung mit β -Catenin (grün).

Abb. 4-87 bis 4-96, rechts: Nur Survivinfrbung ist dargestellt.

Von den insgesamt elf **Tumorproben (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED** zeigen 91% der Proben Survivinfärbung im Zellkern und im Cytoplasma (Abb. 4-97 bis Abb. 4-106). 9% der Proben haben keine Survivin-Zellkernfärbung aber Färbung im Cytoplasma (Abb. 4-107). Die Survivin-Zellkernfärbung bei den positiven Tumorproben ist deutlich stärker als bei den Proben der anderen Untersuchungsgruppen.

Survivinfärbung im Zellkern und im Cytoplasma (Abb. 4-97 bis Abb. 4-106):

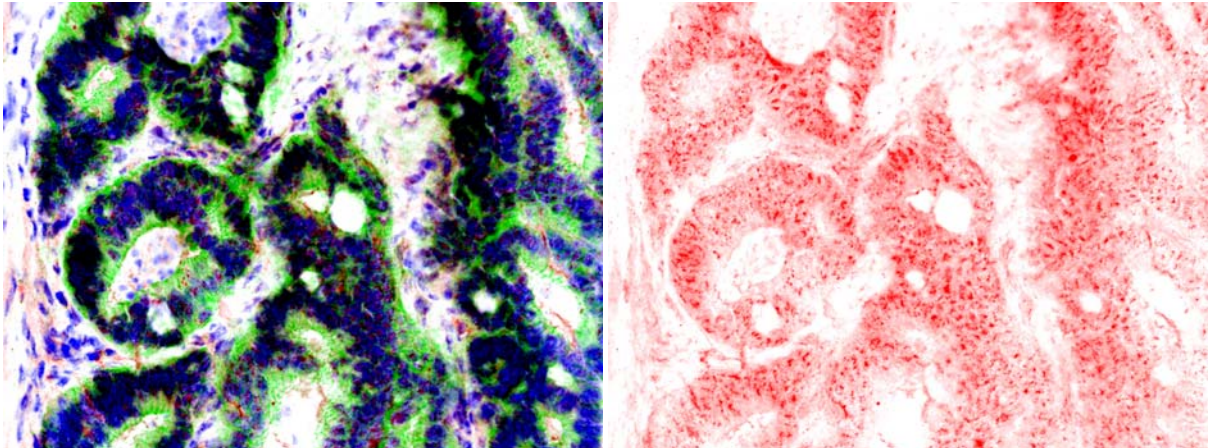


Abb. 4-97.a. Probe Nr. 4163, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

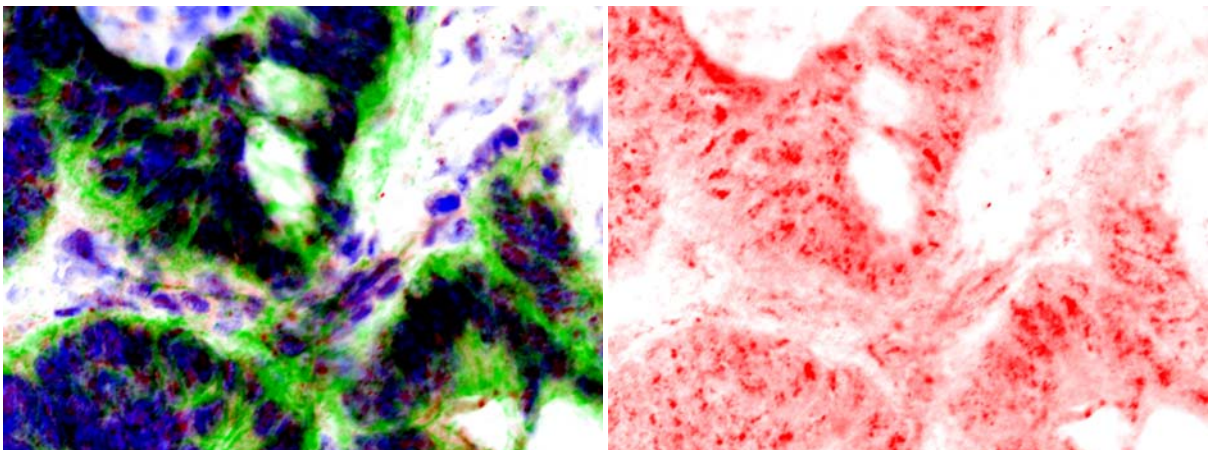


Abb. 4-97.b. Probe Nr. 4163, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-97.a. IF-Färbung von Survivin.

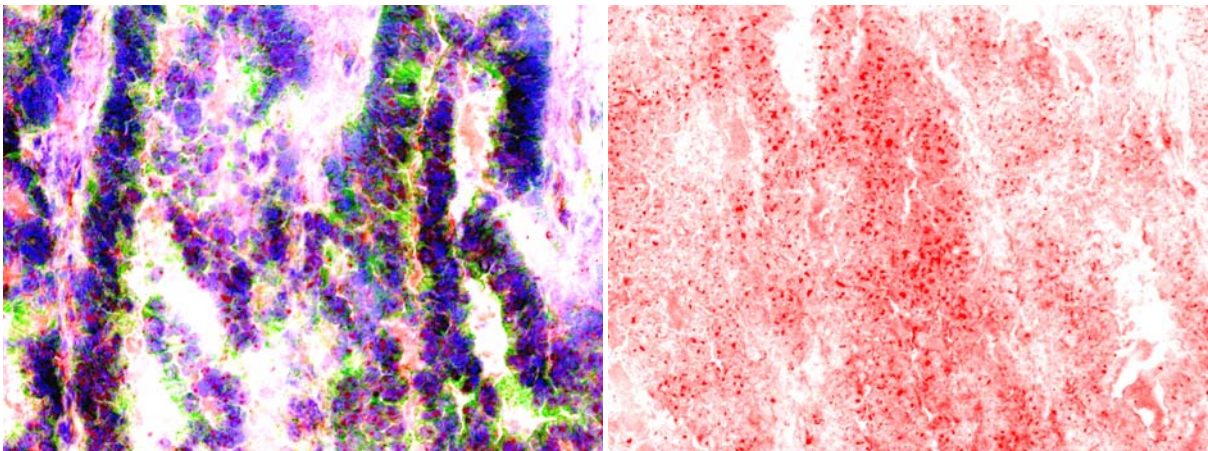


Abb. 4-98. Probe Nr. 3033, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-97 bis 4-98: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Die Zellkerne zeigen deutliche Survivinfärbung. Auch im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen ist Survivinfärbung vorhanden. Abb. rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt.

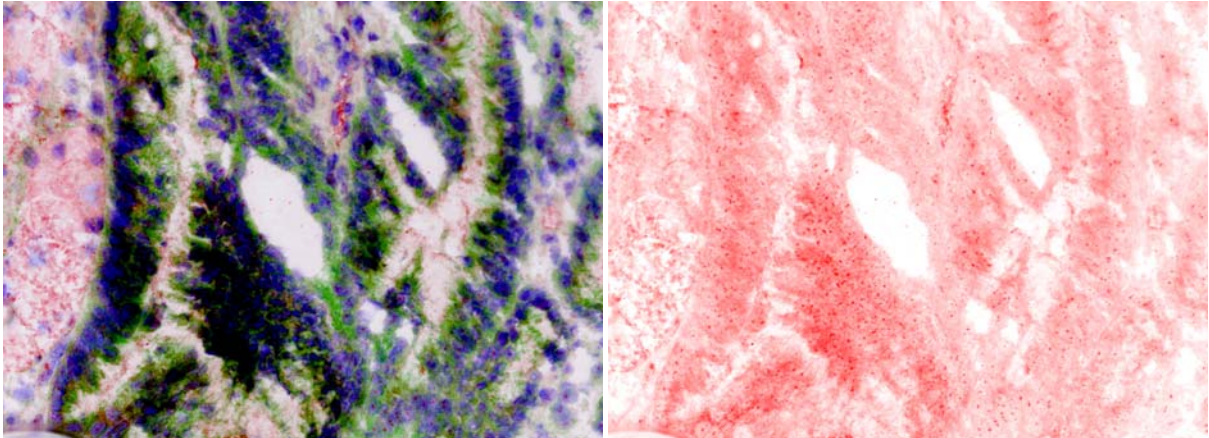


Abb. 4-99.a. Probe Nr. 4830, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

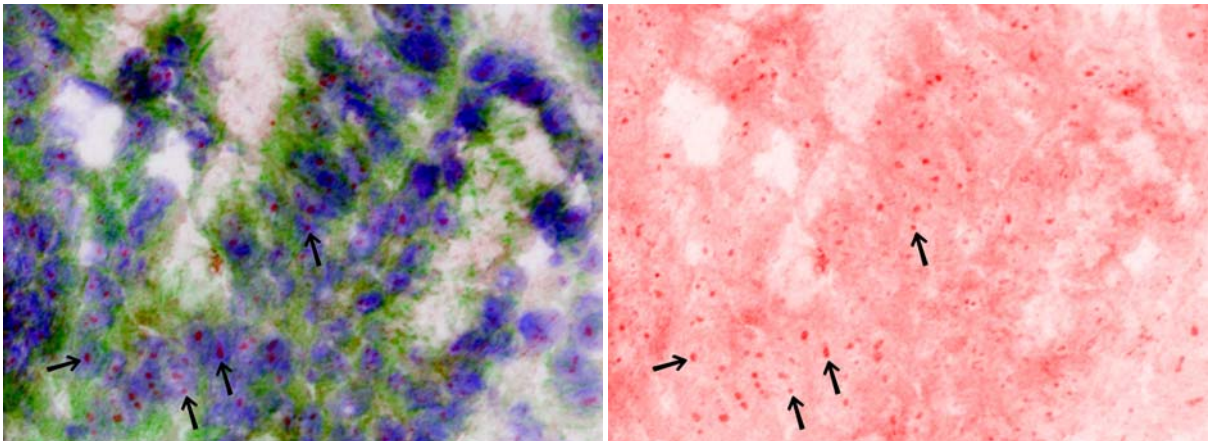


Abb. 4-99.b. Probe Nr. 4830, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-99.a. IF-Färbung von Survivin.

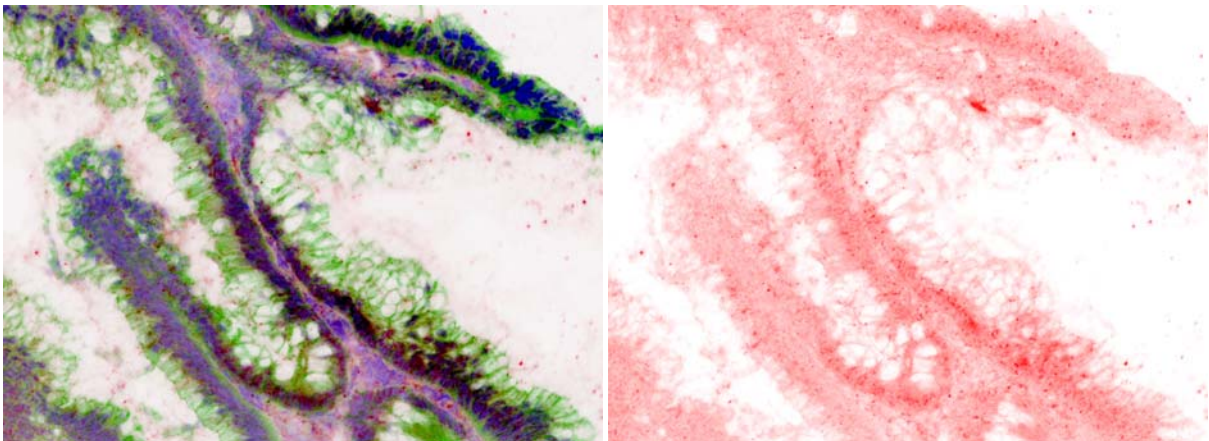


Abb. 4-100.a. Probe Nr. 122, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

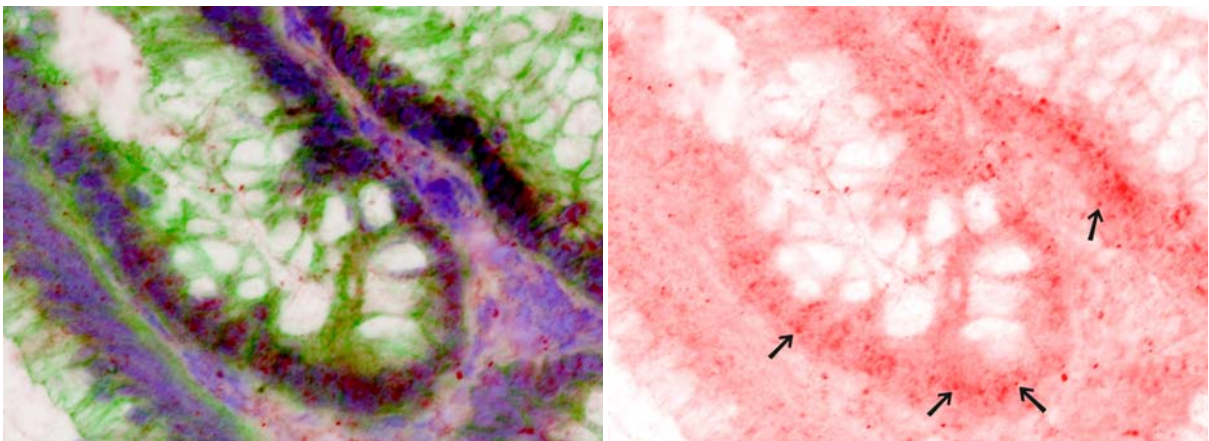


Abb. 4-100.b. Probe Nr. 122, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-100.a. IF-Färbung von Survivin.

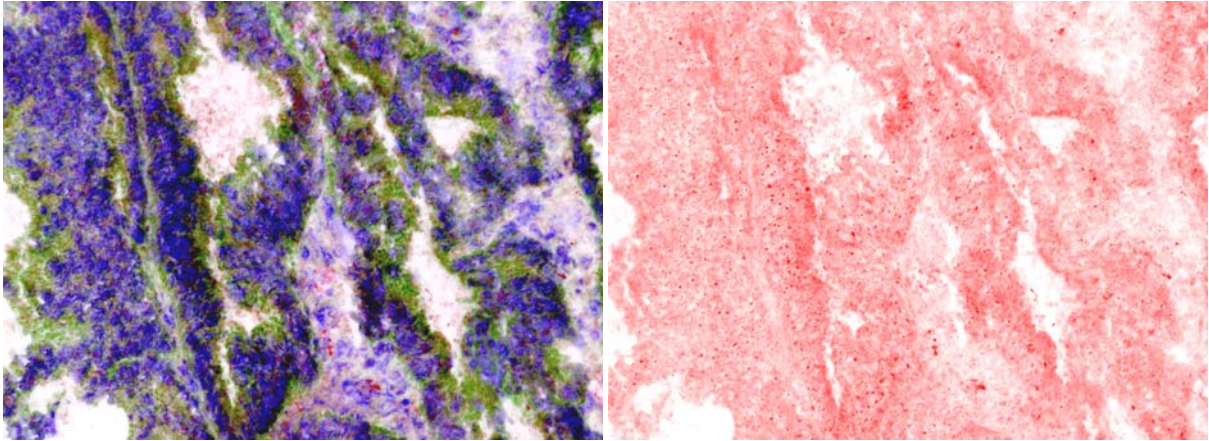


Abb. 4-101.a. Probe Nr. 6846, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

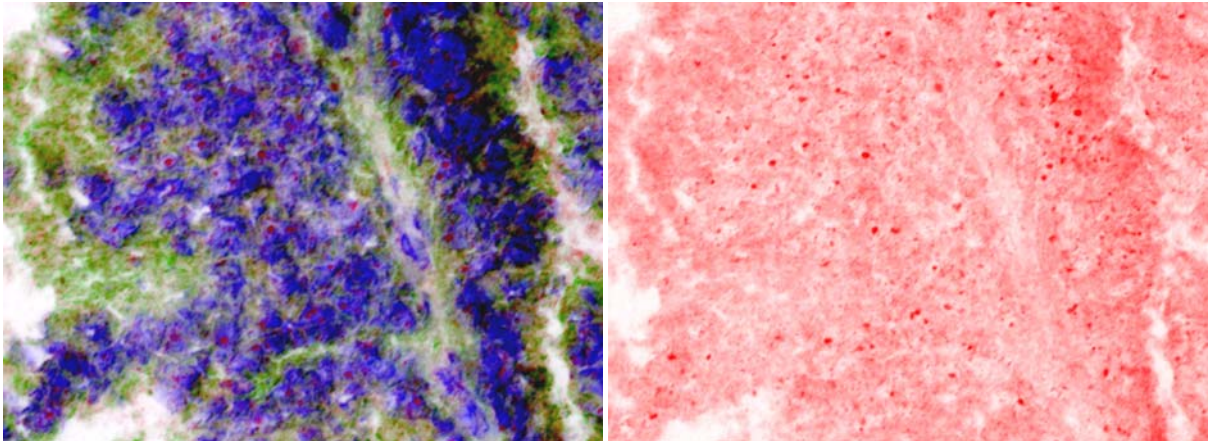


Abb. 4-101.b. Probe Nr. 6846, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-101.a. IF-Färbung von Survivin.

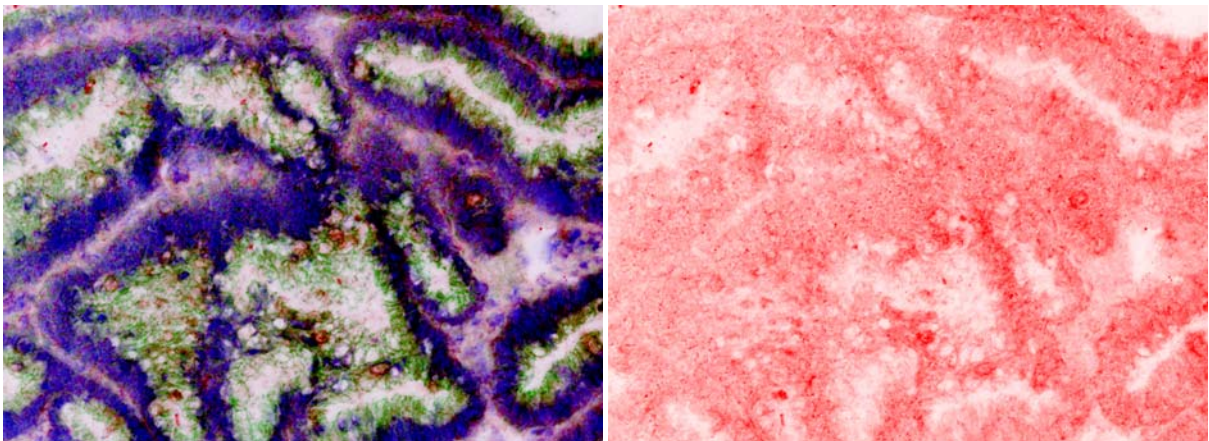


Abb. 4-102.a. Probe Nr. 6550, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

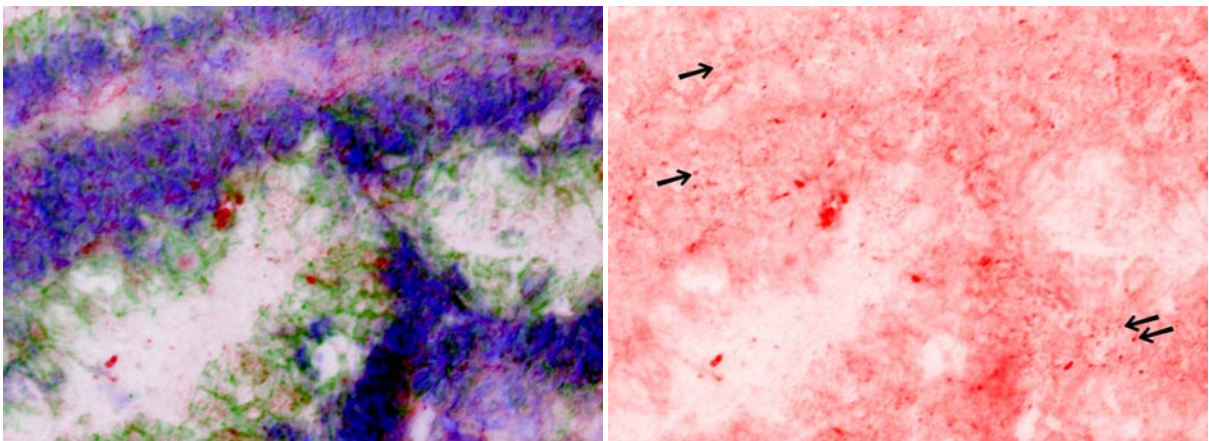


Abb. 4-102.b. Probe Nr. 6550, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-102.a. IF-Färbung von Survivin.

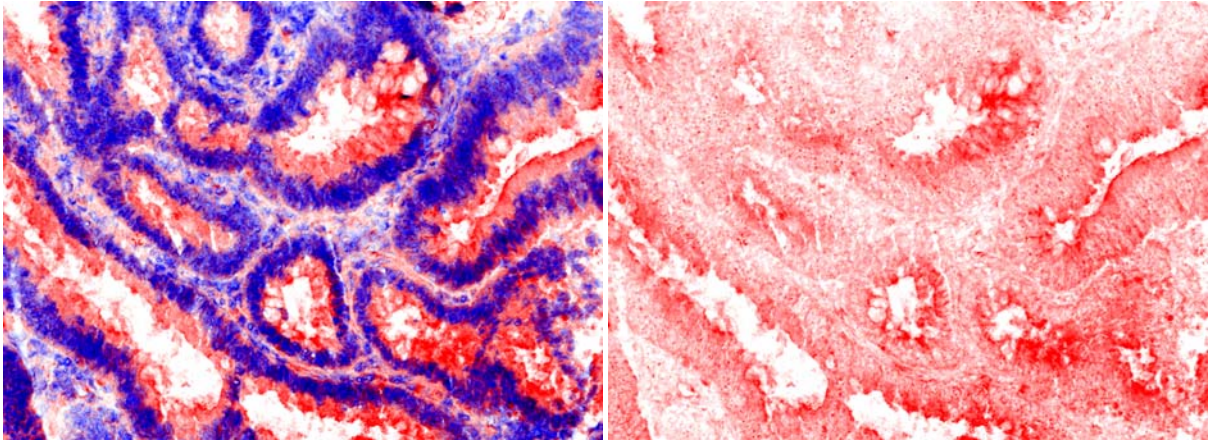


Abb. 4-103.a. Probe Nr. 4642, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

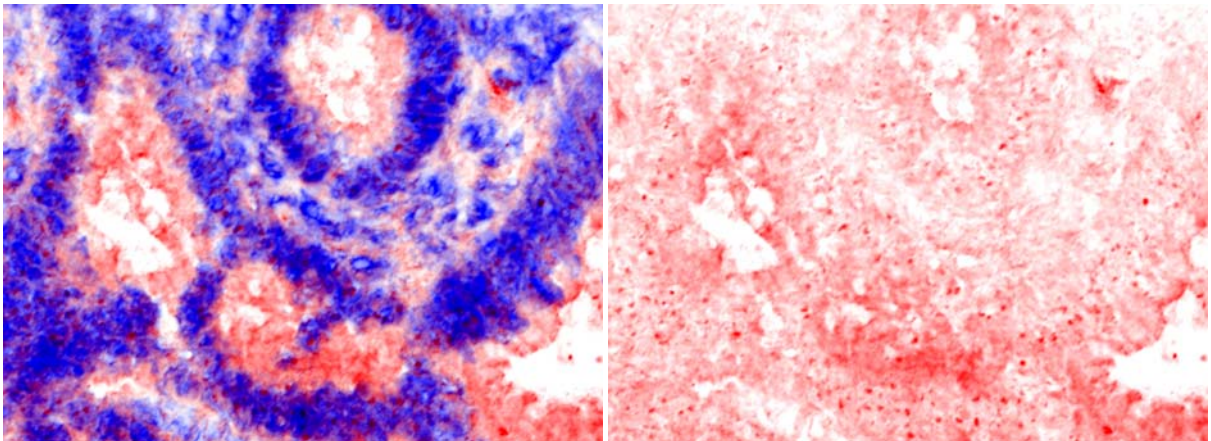


Abb. 4-103.b. Probe Nr. 4642, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-103.a. IF-Färbung von Survivin.

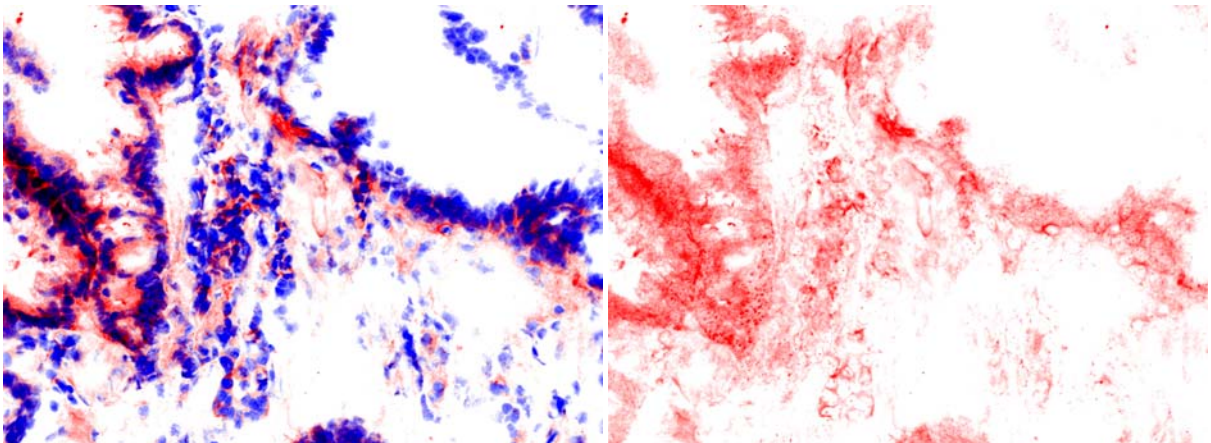


Abb. 4-104.a. Probe Nr. 10402, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

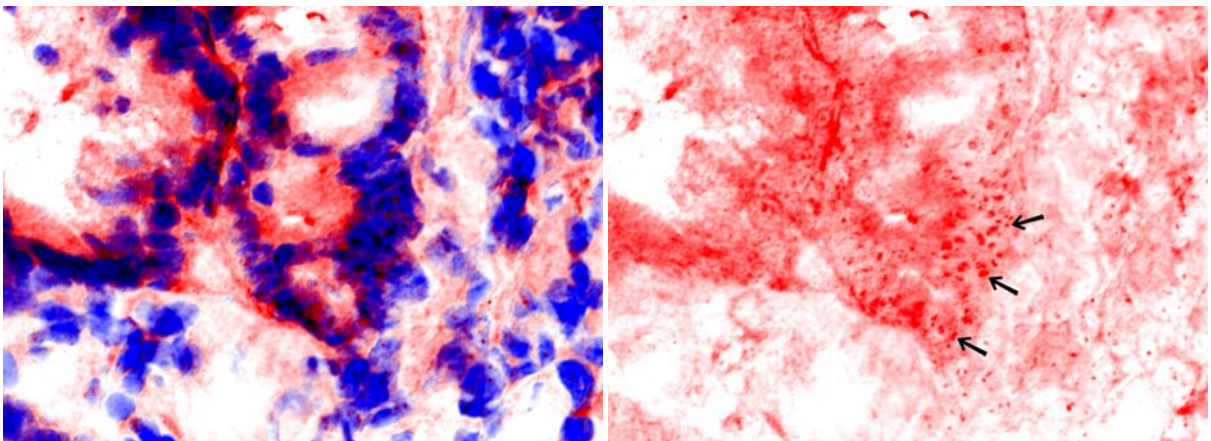


Abb. 4-104.b. Probe Nr. 10402, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-104.a. IF-Färbung von Survivin.

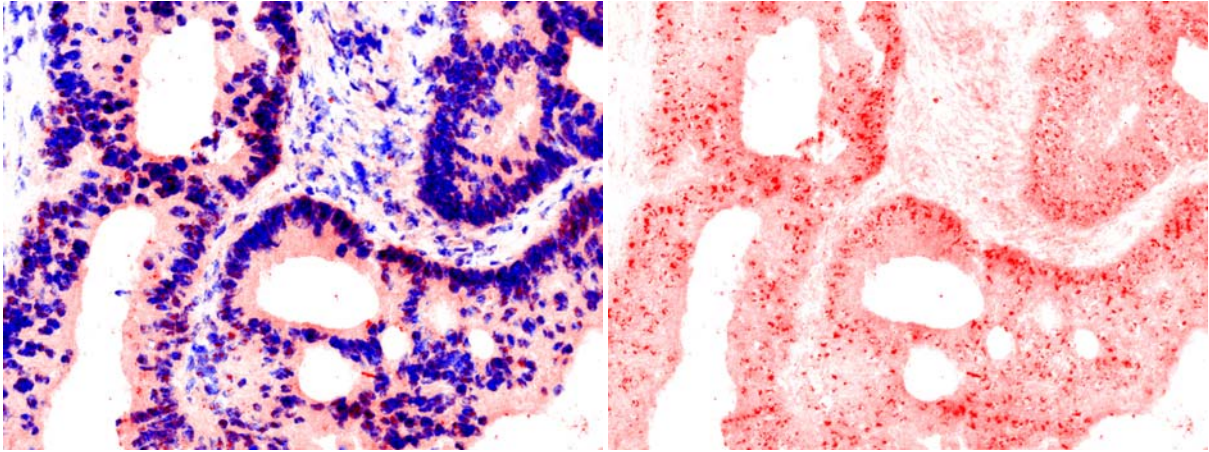


Abb. 4-105. Probe Nr. 4236, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

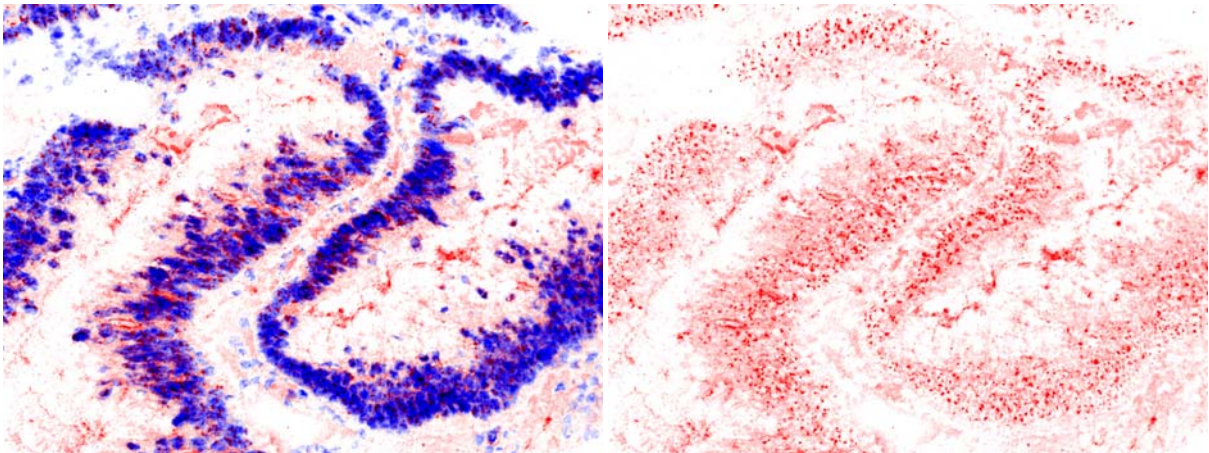


Abb. 4-106. Probe Nr. 4232, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-105 bis 4-106: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt. Die Zellkerne zeigen deutliche Survivinfärbung. Auch im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen ist Survivinfärbung vorhanden.

Keine Survivin-Zellkernfärbung, aber Survivinfärbung im Cytoplasma (Abb. 4-107):

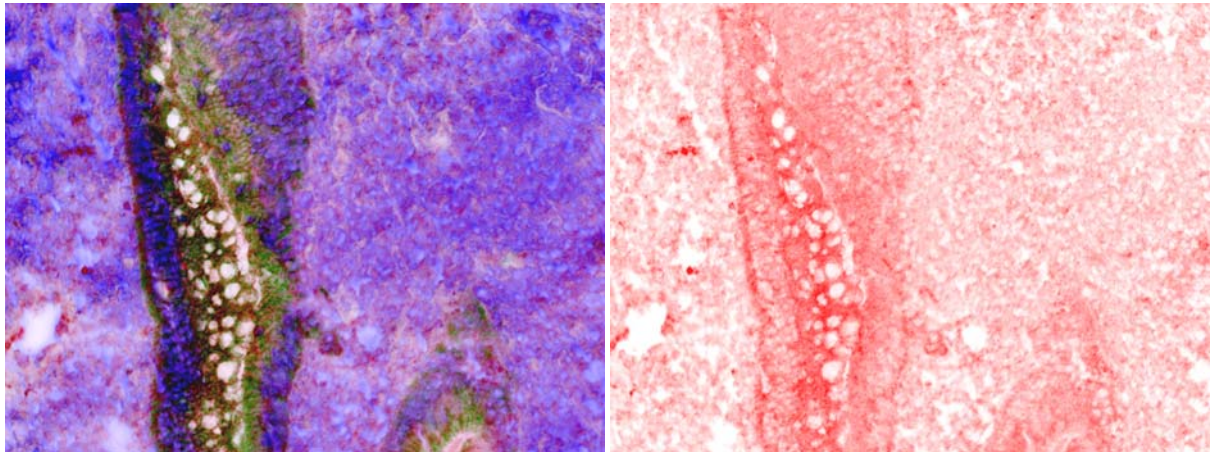


Abb. 4-107.a. Probe Nr. 7464, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von Survivin.

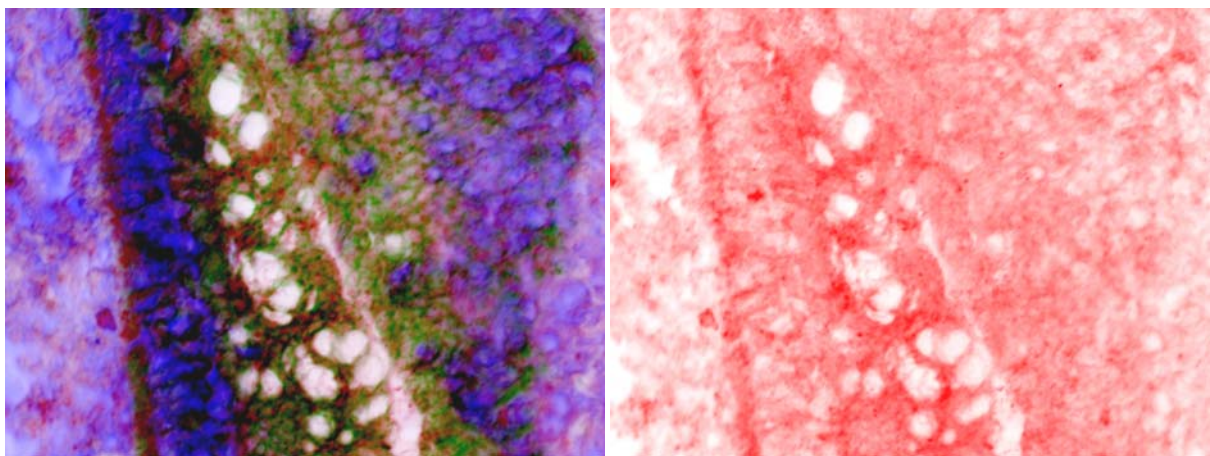


Abb. 4-107.b. Probe Nr. 7464, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-107.a. IF-Färbung von Survivin.

Abb. 4-97 bis Abb. 4-107:

Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. 4-97 bis 4-106: Proben mit Survivinfärbung im Zellkern und im Cytoplasma.

Abb. 4-107: Keine Survivinfärbung im Zellkern, aber Färbung im Cytoplasma.

Abb. 4-97 bis 4-102 und 4-107, links: Doppelfärbung mit β -Catenin (grün).

Abb. 4-97 bis 4-107, rechts: Nur Survivinfärbung ist dargestellt.

Was die Survivinfärbung betrifft, lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei den **Polyp- und Tumorproben** der Anteil an Proben mit Zellkernfärbung am größten ist (90% bzw. 91%). Auch scheint die Intensität der Zellkernfärbung in diesen beiden Gruppen am stärksten zu sein.

Bei der Gruppe der **CU-Proben** ist der Anteil an Proben mit Survivin-Zellkernfärbung am kleinsten (75%) im Vergleich zu den anderen Gruppen Normal, Polyp, Tumor. Bei der CU- und Normal-Gruppe gibt es den größten Anteil an Proben ohne Zellkern- aber mit cytoplasmatischer Färbung.

Diese Variante der Survivinfärbung ist in der Gruppe Polyp überhaupt nicht repräsentiert; bei den Tumorproben trifft diese Variante auf eine Probe zu (Abb. 4-107). Morphologisch hat diese Tumorprobe als einzige Ähnlichkeit mit den CU-Proben.

4.1.4. Immunfluoreszenzfärbung von p53

In den p53-positiven Proben tritt die p53-Färbung im Zellkern auf, durch Anreicherung defekter und daher stabilerer p53-Proteine. In manchen Proben scheint es auch cytoplasmatische p53-Färbung zu geben.

Alle zehn **Kolonepithel-Normalproben von Menschen ohne CED** sind negativ bezüglich einer p53-Färbung im Zellkern (Abb. 4-108 bis Abb. 4-117).

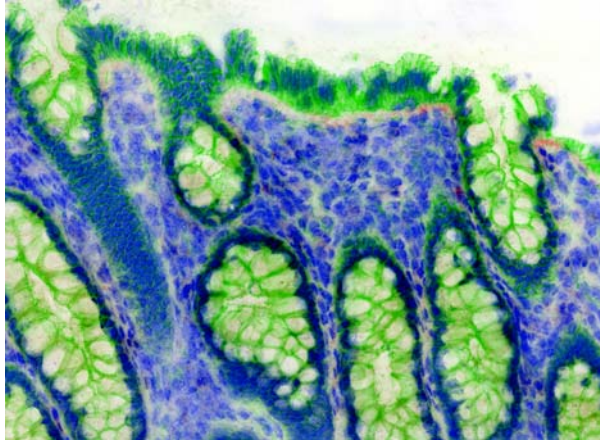


Abb. 4-108. Probe Nr. 4232, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

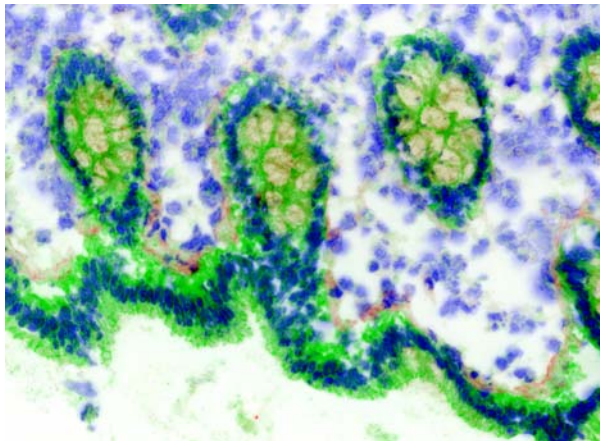


Abb. 4-109. Probe Nr. 4163., Normal. Originalvergrößerung 200 x.

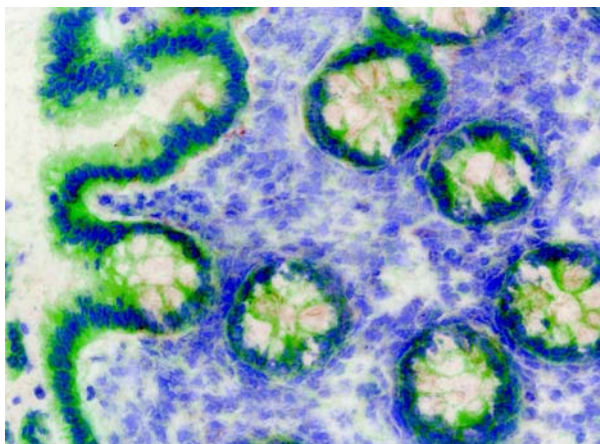


Abb. 4-110. Probe Nr. 4236, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

Abb. 4-108 bis 4-110: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt. Es ist keine p53-Färbung im Zellkern vorhanden. Es ist schwache cytoplasmatische Färbung erkennbar. In Abb. 4-109 handelt es sich bei der Färbung innerhalb der Krypten um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Schleim der Becherzellen.

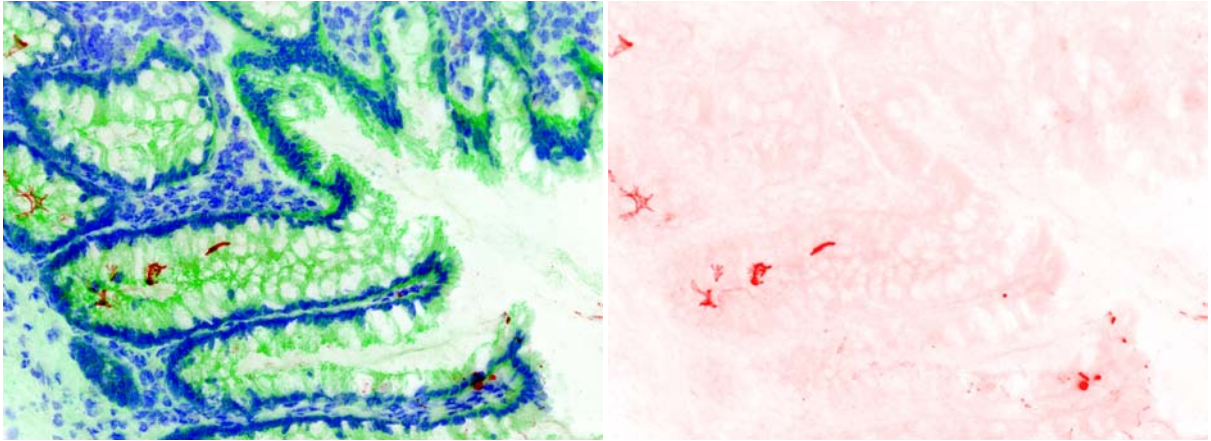


Abb. 4-111. Probe Nr. 326, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

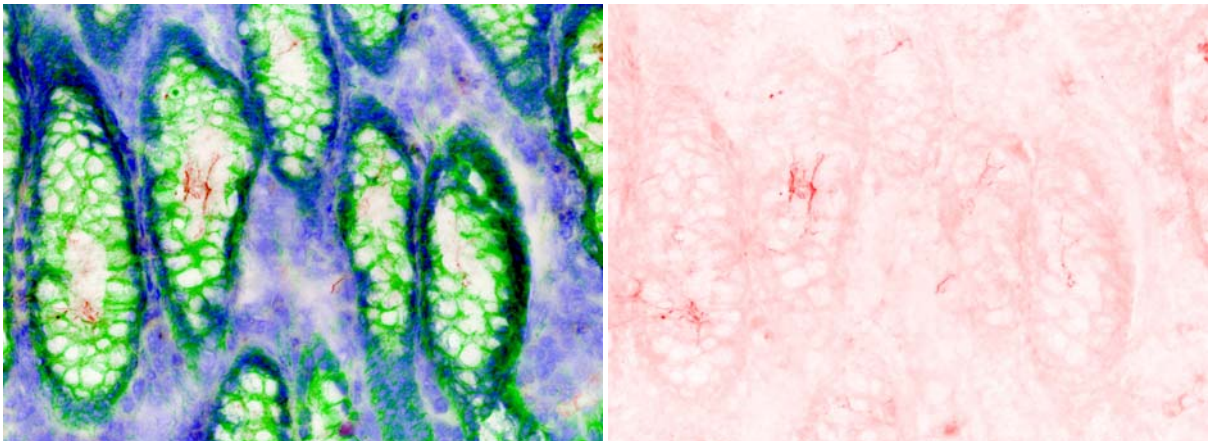


Abb. 4-112. Probe Nr. 4346, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

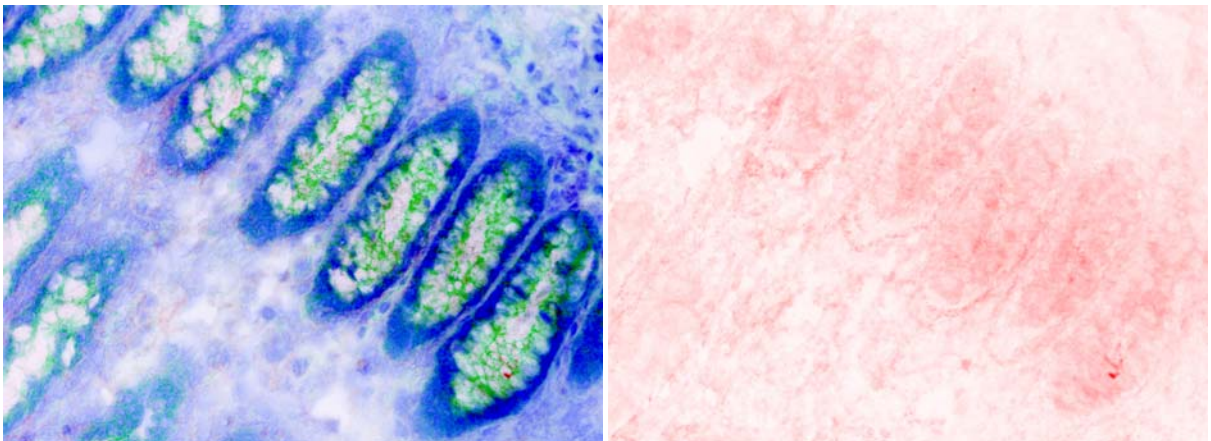


Abb. 4-113. Probe Nr. 2842, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

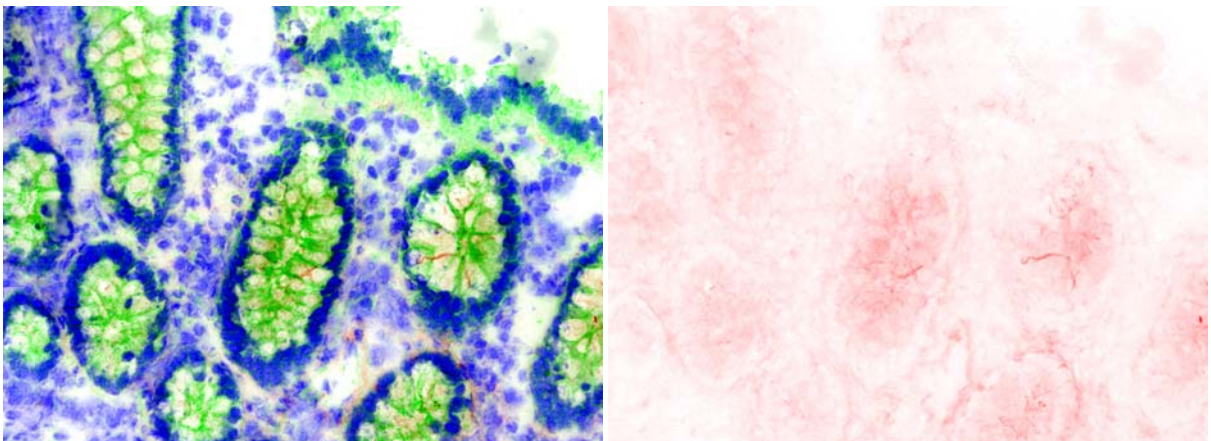


Abb. 4-114. Probe Nr. 4830, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

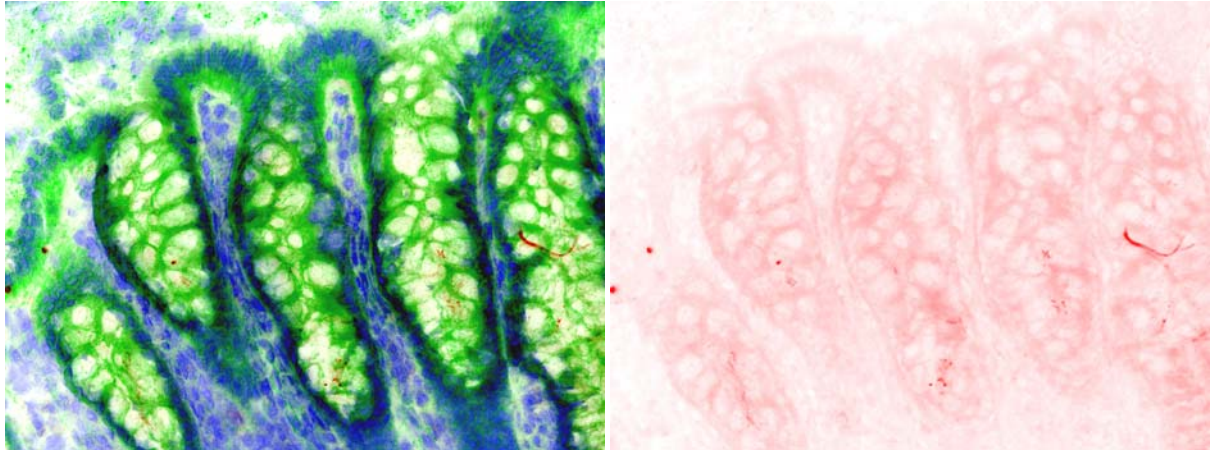


Abb. 4-115. Probe Nr. 4248, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

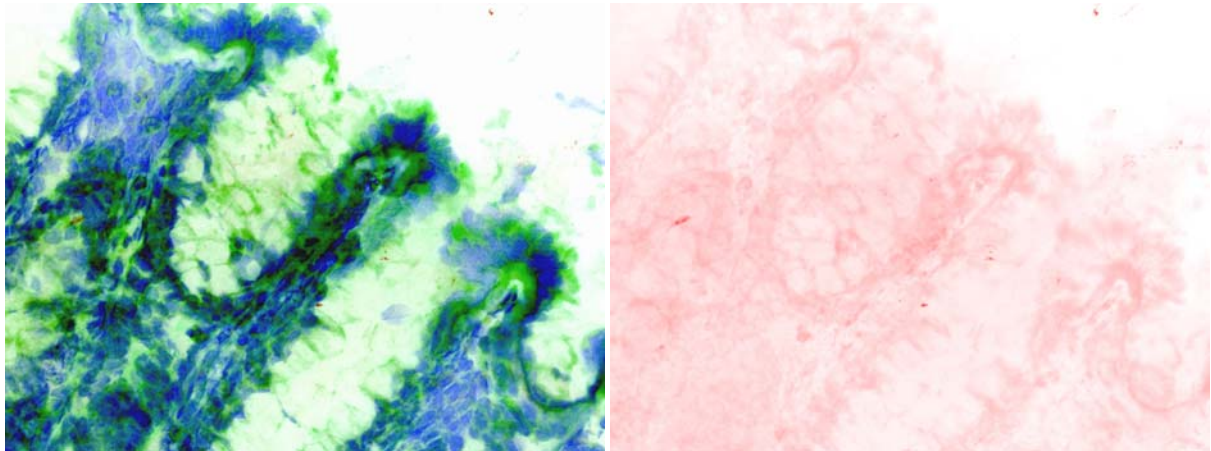


Abb. 4-116. Probe Nr. 10402, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

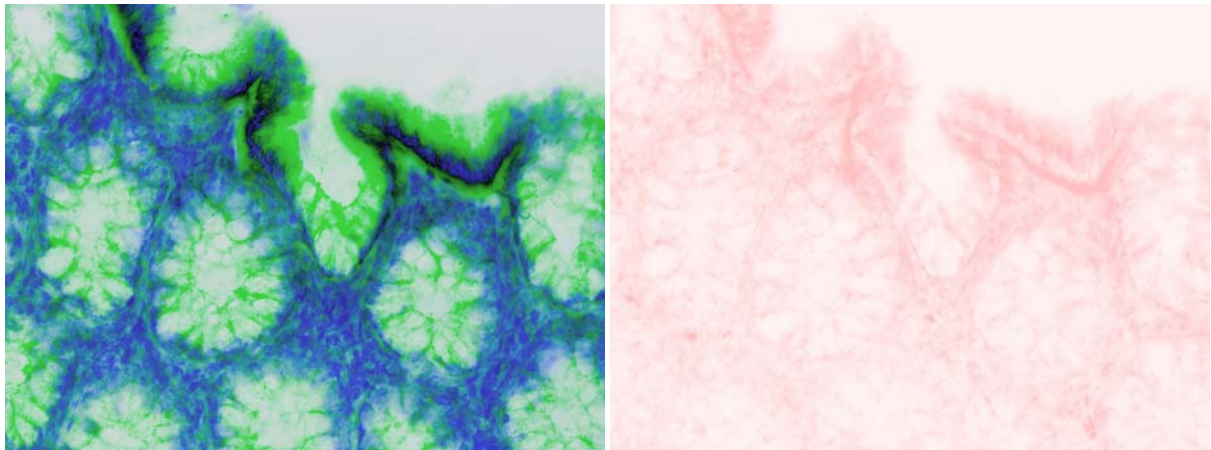


Abb. 4-117. Probe Nr. 3033, Normal. Originalvergrößerung 200 x.

Abb. 4-108 bis Abb. 4-117:

Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Normalgewebe von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt. Es ist keine p53-Färbung der Zellkerne vorhanden. Es scheint schwache cytoplasmatische Färbung vorhanden zu sein.

Abb. 4-108 bis 4-117, links: Doppelfärbung mit β -Catenin (grün).

Abb. 4-108 bis 4-117, rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt.

Von den 20 **Kolonepithelproben von Menschen mit Colitis Ulcerosa** sind 19 Proben p53-negativ, das heißt es ist keine p53-Färbung im Zellkern sichtbar (Abb. 4-118 bis Abb. 4-136). Die einzige positive Probe mit p53-Färbung im Zellkern ist eine der beiden Polypproben der CU-Gruppe (Abb. 4-137). Die andere der beiden untersuchten Polypproben der CU-Gruppe ist p53-negativ (Abb. 4-124).

Bei manchen Proben scheint es eine cytoplasmatische p53-Färbung zu geben.

Keine p53-Färbung im Zellkern (Abb. 4-118 bis Abb. 4-136):

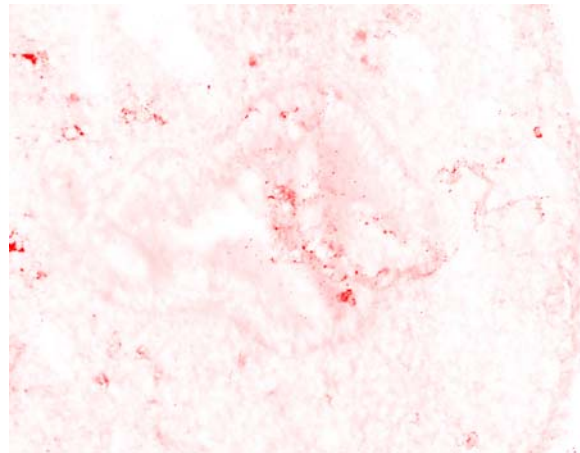
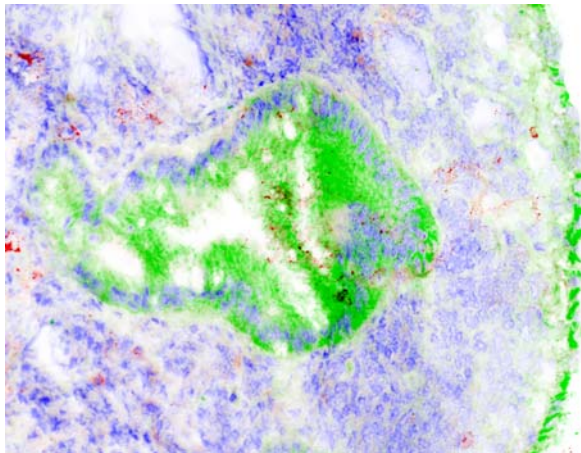


Abb. 4-118. Probe Nr. 522, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

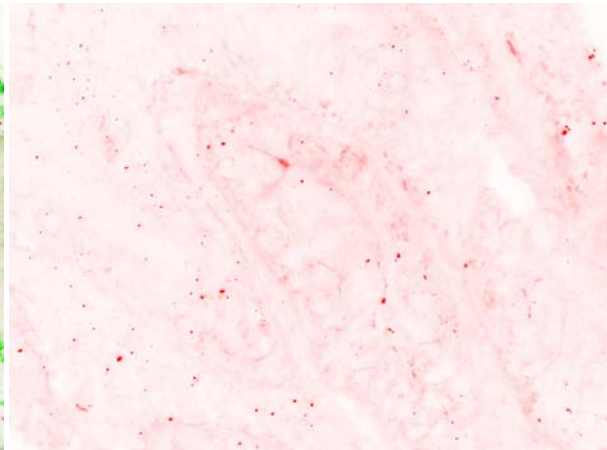
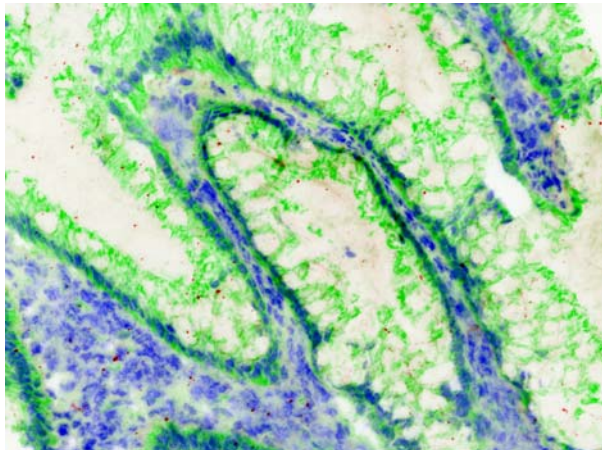


Abb. 4-119. Probe Nr. 566, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

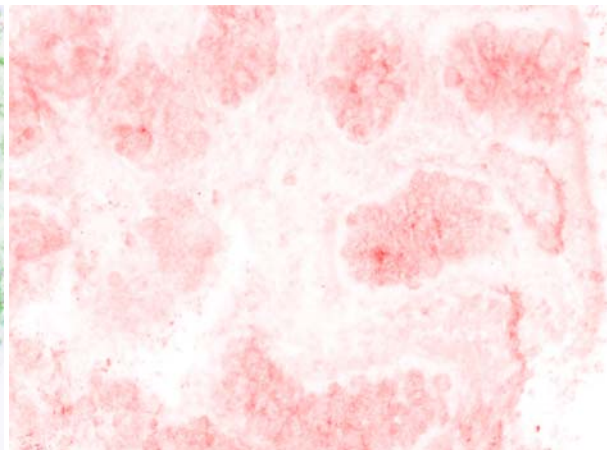
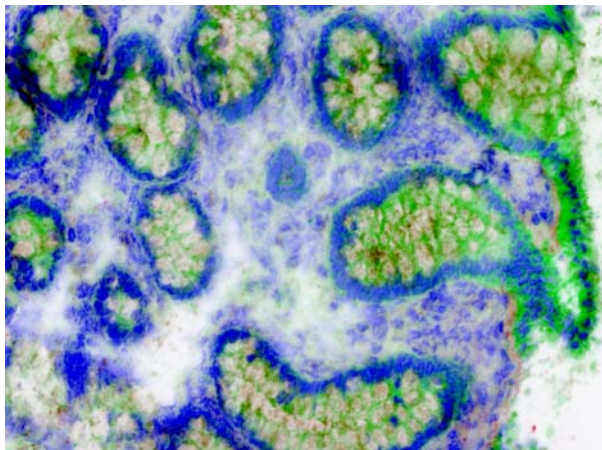


Abb. 4-120. Probe Nr. 610, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-118 bis 4-120: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Gewebe von CU-Patienten. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt. Es ist keine p53-Zellkernfärbung vorhanden.

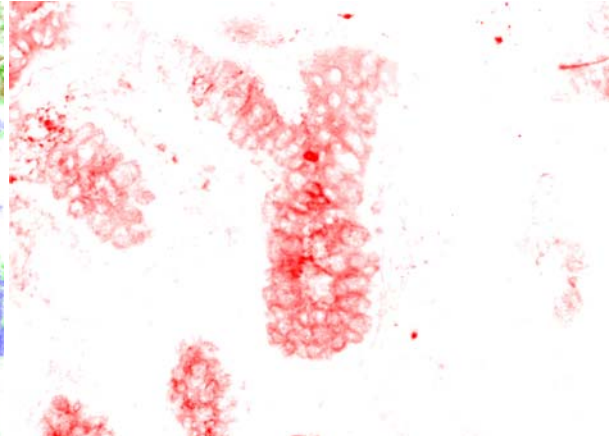
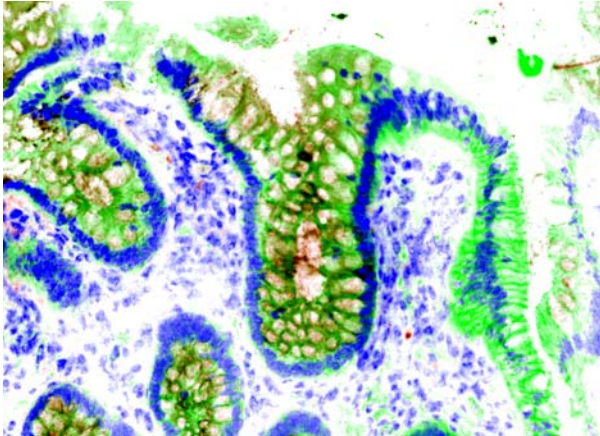


Abb. 4-121. Probe Nr. 474, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

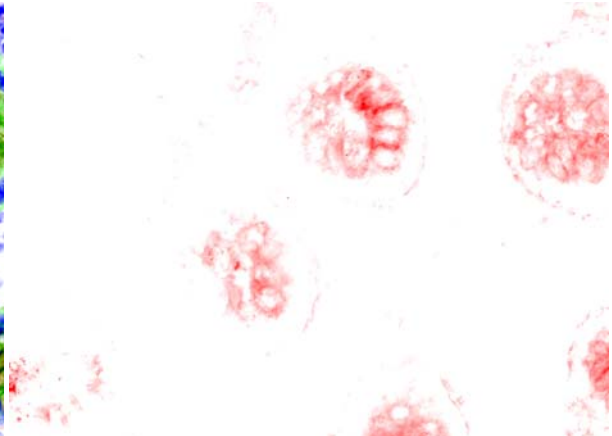
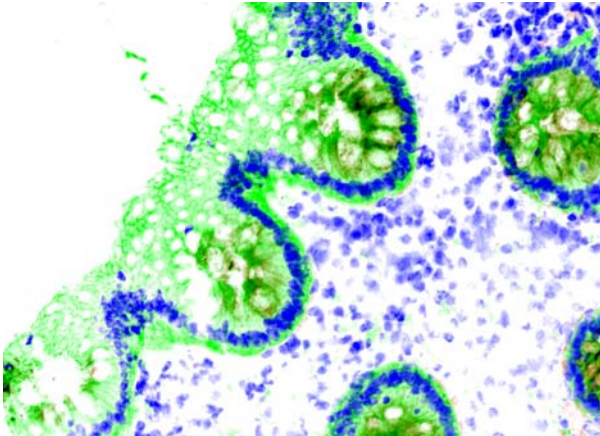


Abb. 4-122. Probe Nr. 475, CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

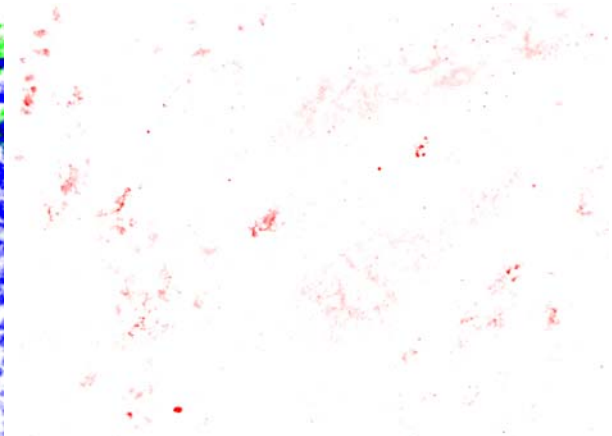
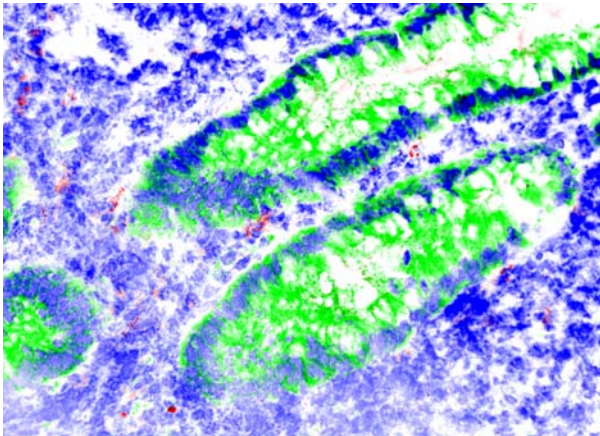


Abb. 4-123. Probe Nr. 595, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

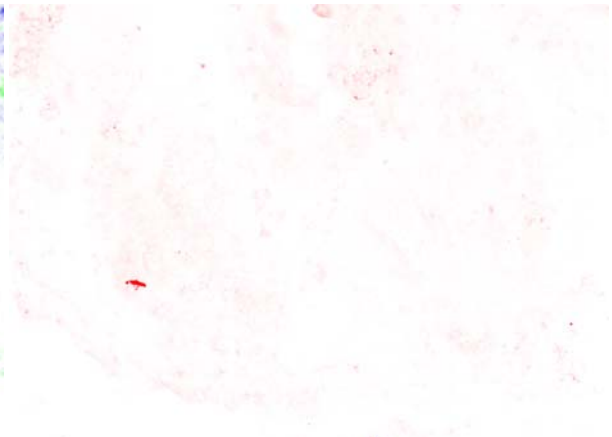
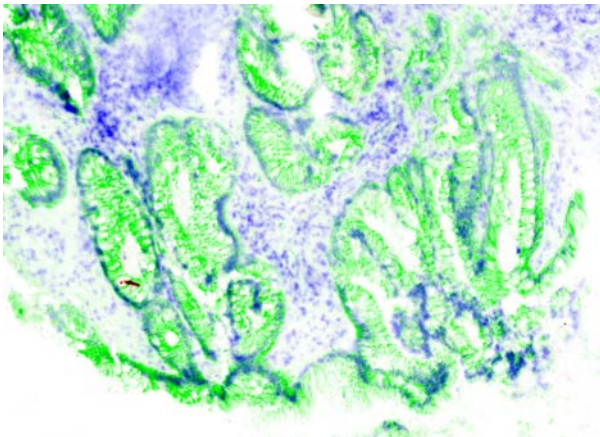


Abb. 4-124. Probe Nr. 523, CU, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

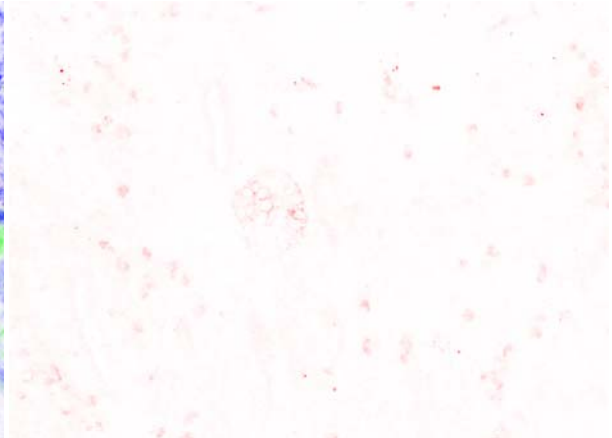
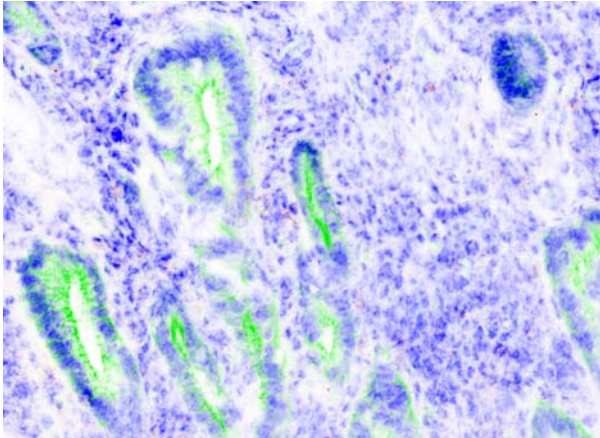


Abb. 4-125. Probe Nr. 562, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

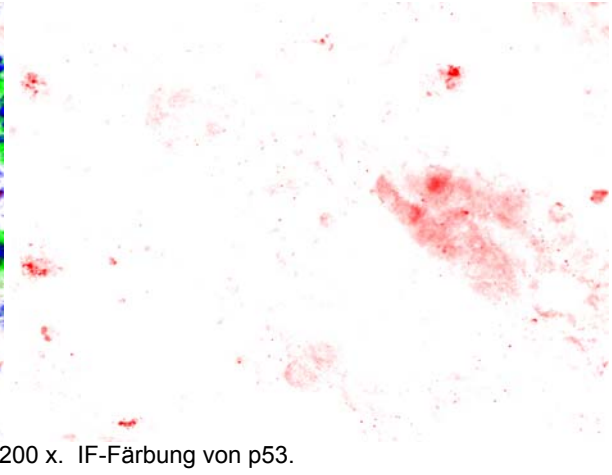
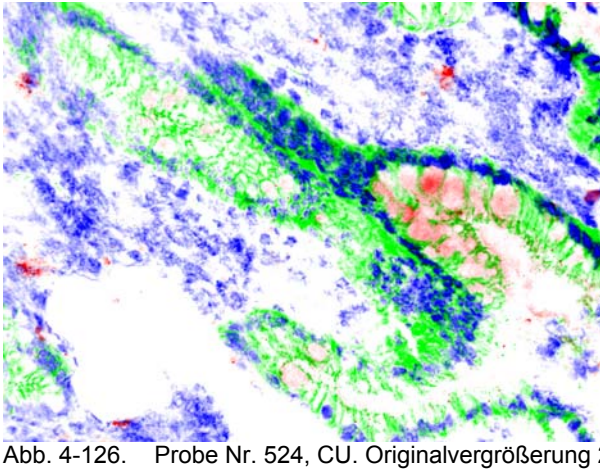


Abb. 4-126. Probe Nr. 524, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

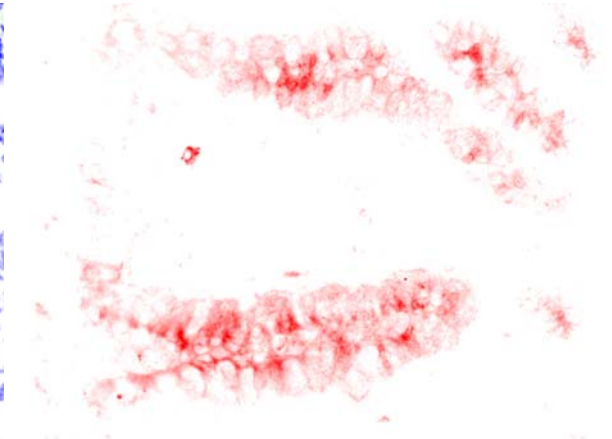
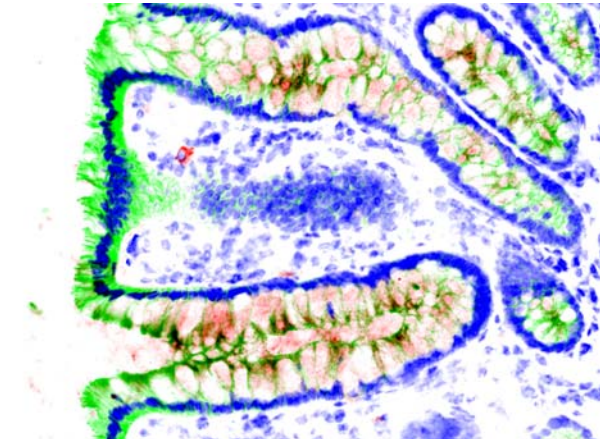


Abb. 4-127. Probe Nr. 584, CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

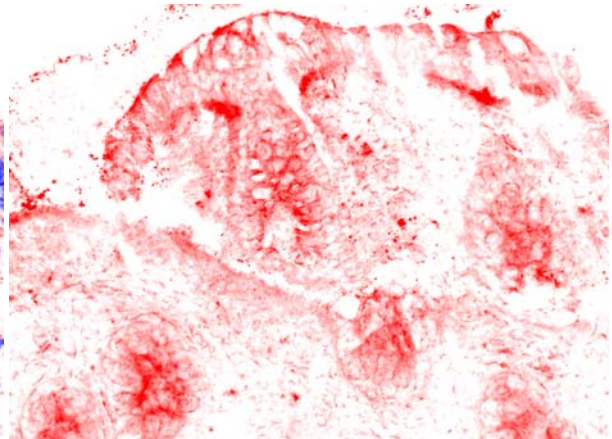
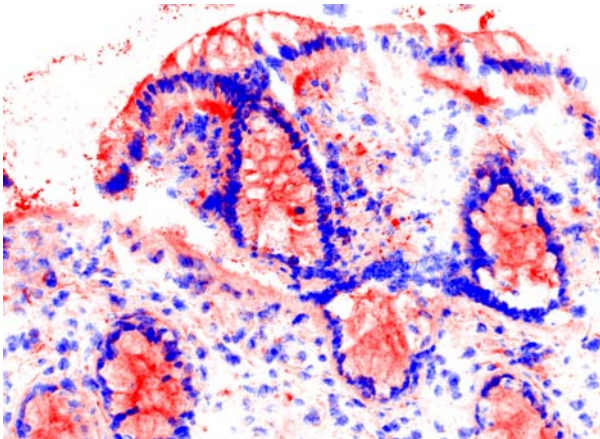


Abb. 4-128. Probe Nr. 536, CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

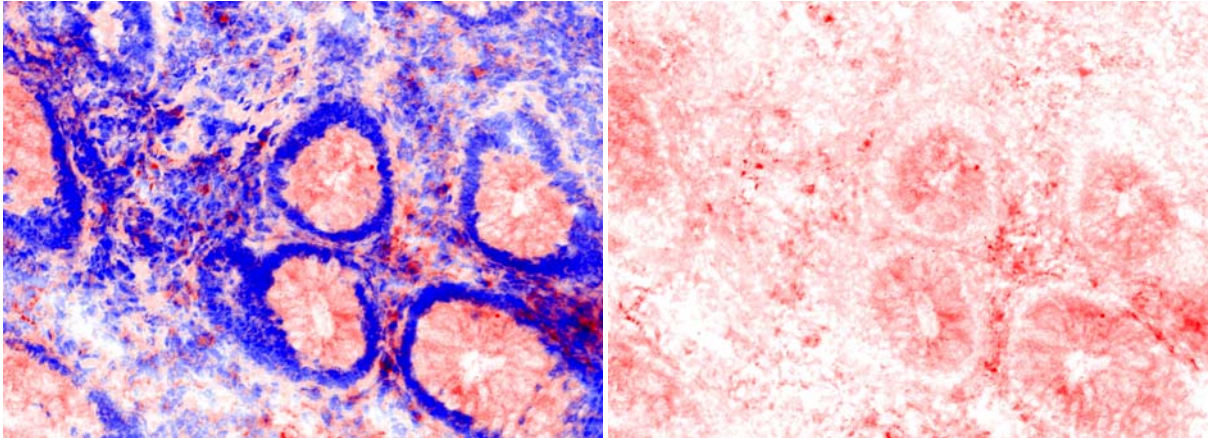


Abb. 4-129. Probe Nr. 586, CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

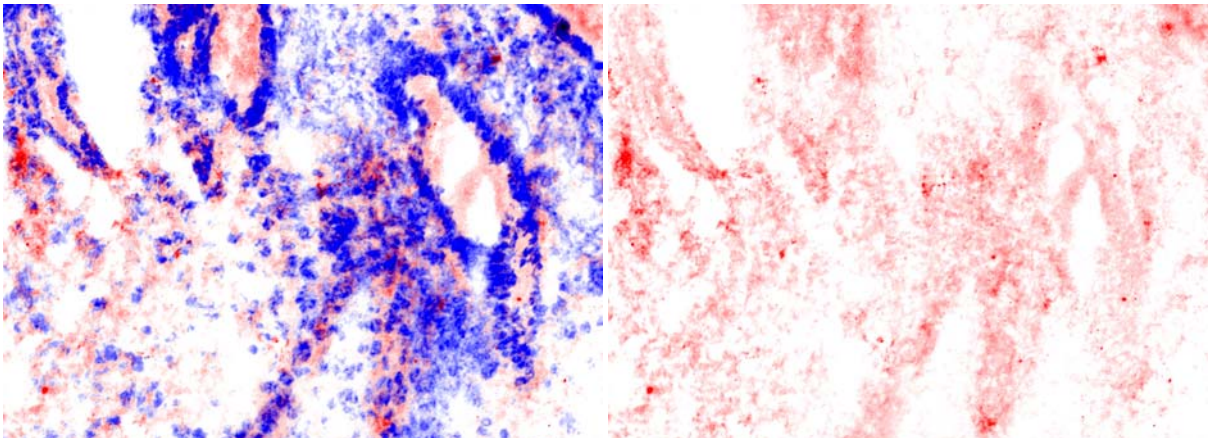


Abb. 4-130. Probe Nr. 574, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

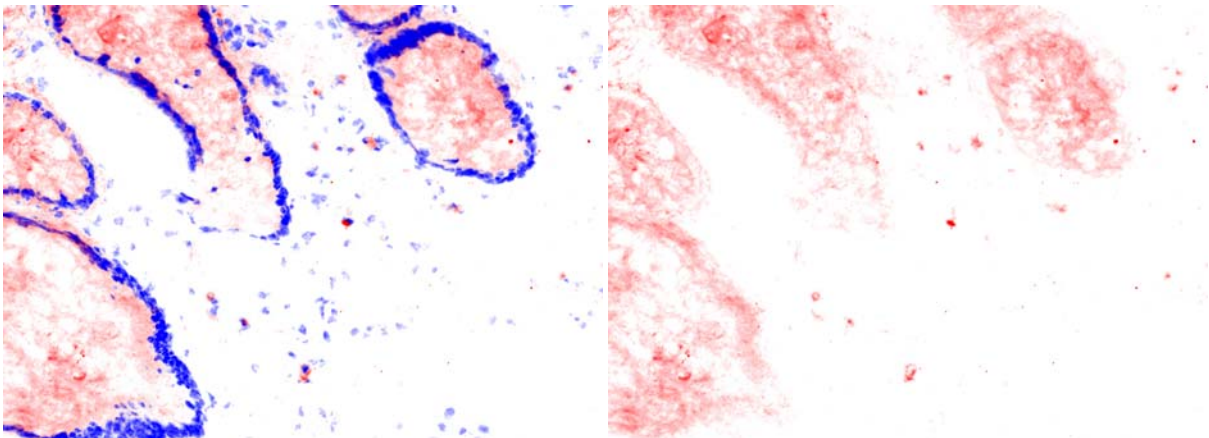


Abb. 4-131. Probe Nr. 544, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

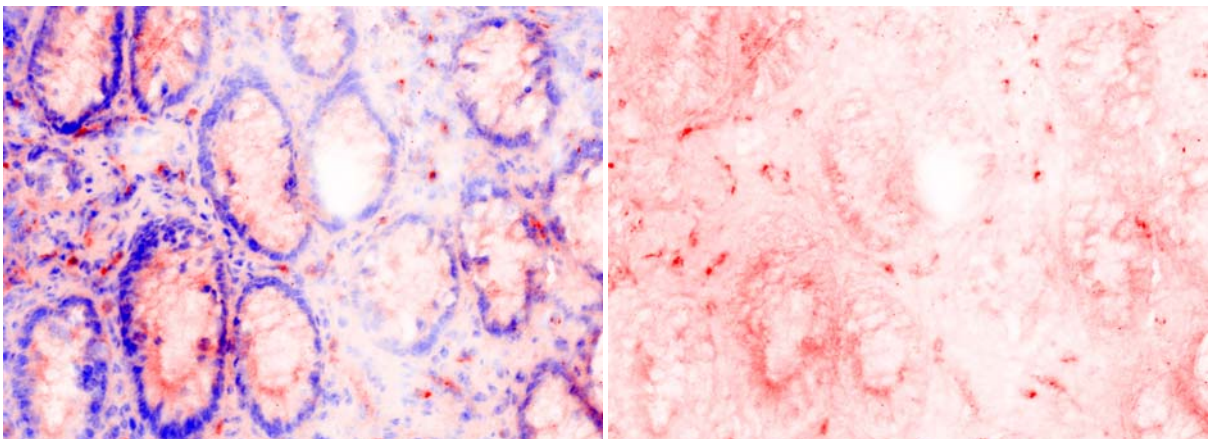


Abb. 4-132. Probe Nr. 527, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

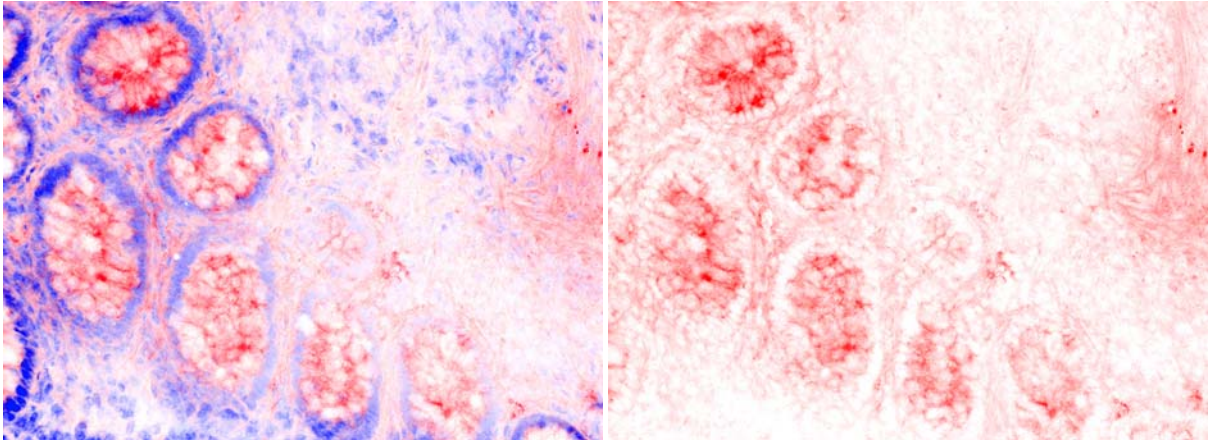


Abb. 4-133. Probe Nr. 577, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

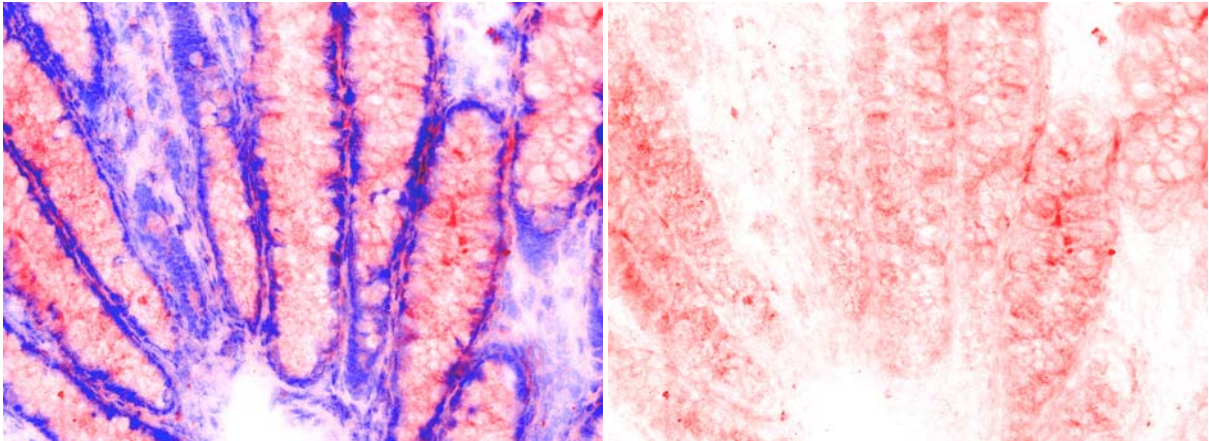


Abb. 4-134. Probe Nr. 608, CU, Pseudopolyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

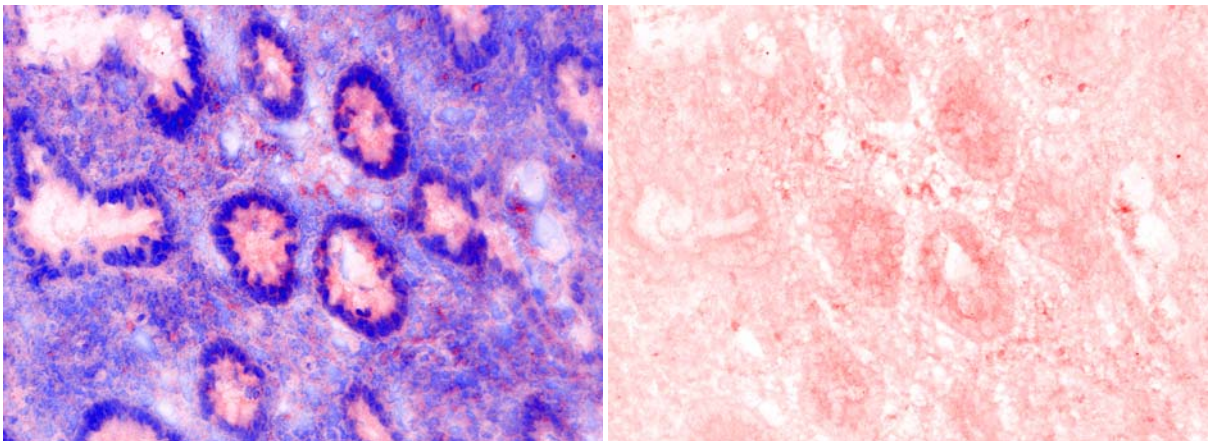


Abb. 4-135. Probe Nr. 571, CU. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

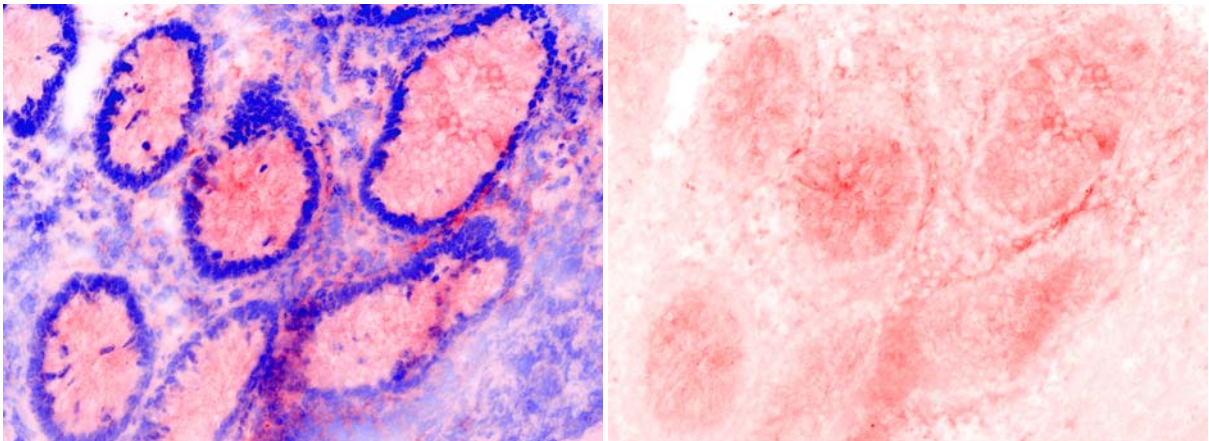


Abb. 4-136. Probe Nr. 552, CED (CU oder MC). Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

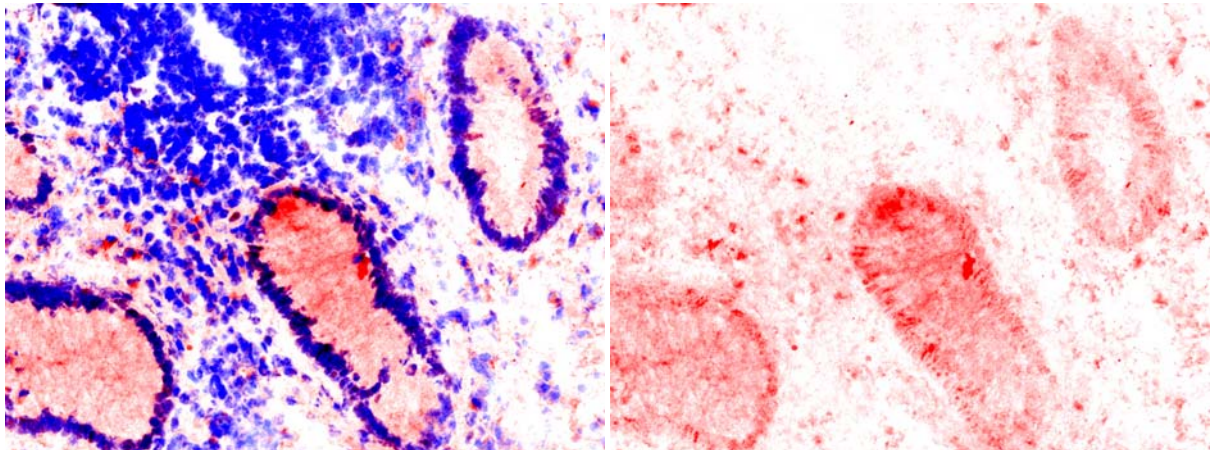
Probe mit p53-Färbung im Zellkern (Abb. 4-137):

Abb. 4-137.a. Probe Nr. 583, CU, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

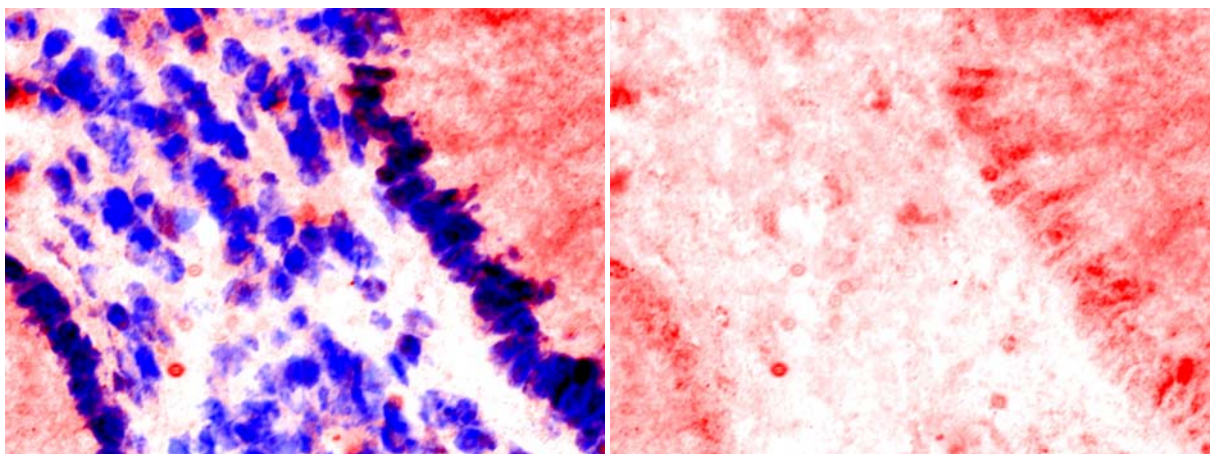


Abb. 4-137.b. Probe Nr. 583, CU, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-137.a. IF-Färbung von p53.

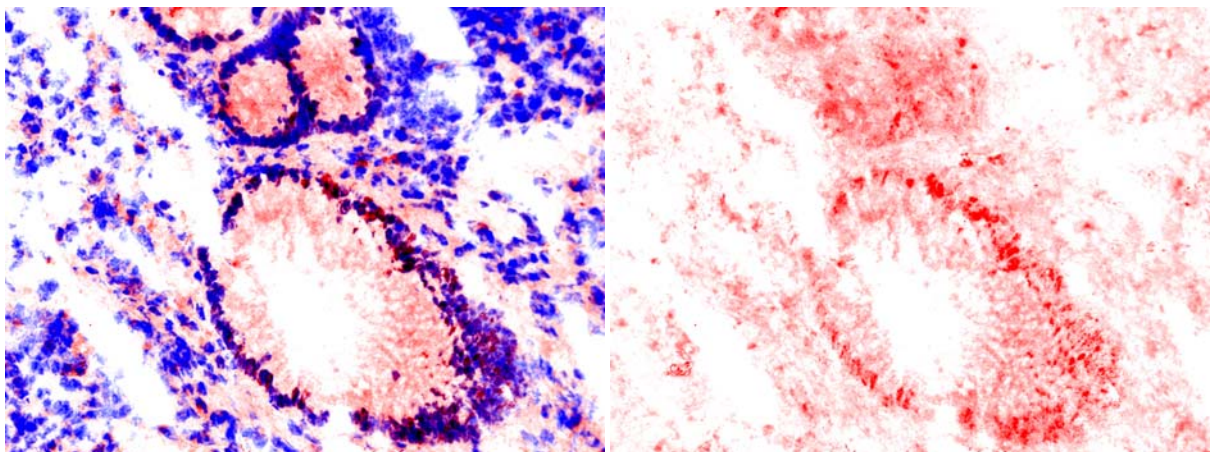


Abb. 4-137.c. Probe Nr. 583, CU, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-118 bis Abb. 4-137:

Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Gewebe von CED-Patienten. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. 4-118 bis 4-136: Es ist keine p53-Färbung im Zellkern vorhanden.

Abb. 4-118, 4-119, 4-121, 4-122 und 4-127 bis 4-137: Es scheint cytoplasmatische p53-Färbung vorhanden zu sein.

Abb. 4-120: Beim Signal handelt es sich um eine unspezifische Reaktion der Antikörper mit dem Schleim der Becherzellen.

Abb. 4-137: Die Polypprobe des CU-Patienten hat p53-Färbung in den Zellkernen der Kryptenepithelzellen.

Abb. 4-118 bis 4-127, links: Doppelfärbung mit β -Catenin (grün).

Abb. 4-118 bis 4-137, rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt.

Genau die Hälfte der zehn **Polyproben von Menschen ohne CED** sind p53-positiv bezüglich einer p53-Färbung im Zellkern (Abb. 4-138 bis Abb. 4-142); die anderen 50% der Proben sind p53-negativ (Abb. 4-143 bis Abb. 4-147). Die p53-Zellkernfärbung der positiven Proben betrifft ausschließlich die Zellkerne der Kryptenepithelzellen.

Proben mit p53-Färbung im Zellkern (Abb. 4-138 bis Abb. 4-142):

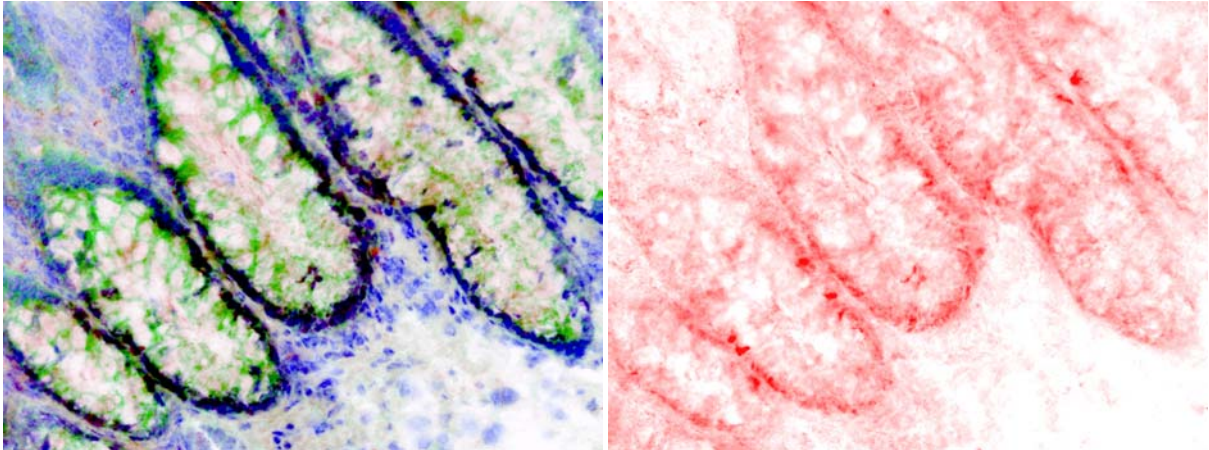


Abb. 4-138.a. Probe Nr. 618, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

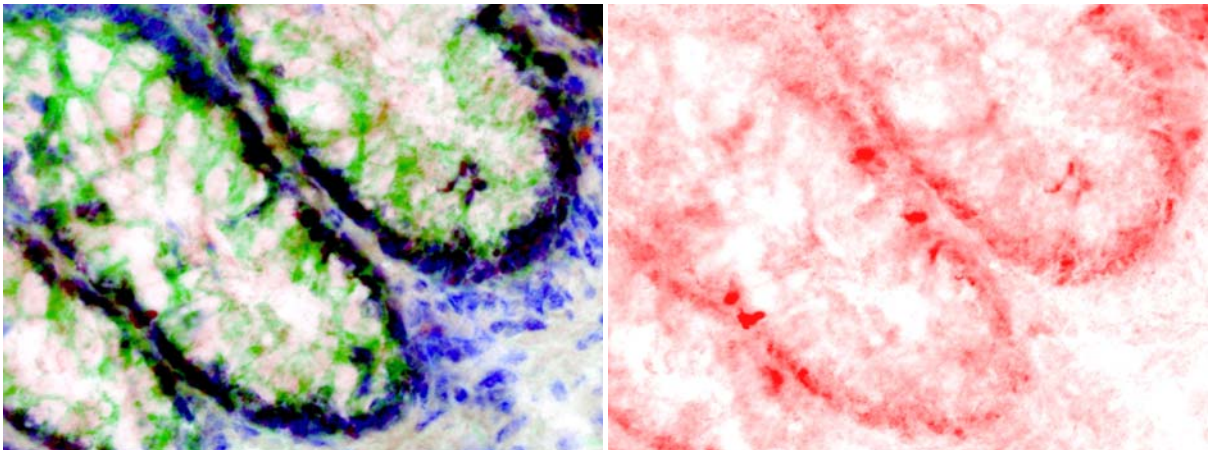


Abb. 4-138.b. Probe Nr. 618, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-138.a. IF-Färbung von p53.

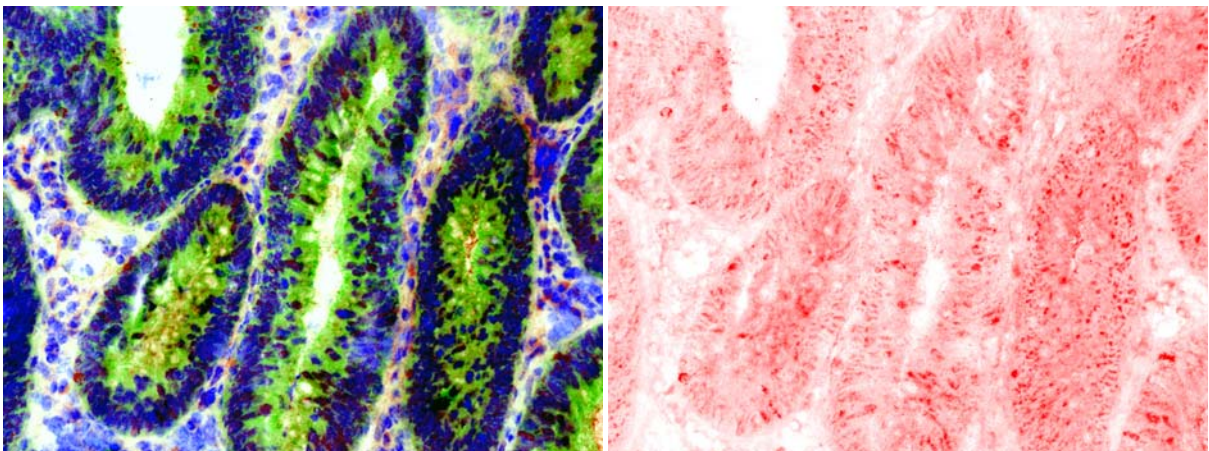


Abb. 4-139. Probe Nr. 603, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-138 bis 4-139: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Polypgewebe von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt. Es ist deutliche p53-Färbung in den Zellkernen der Kryptenepithelzellen vorhanden.

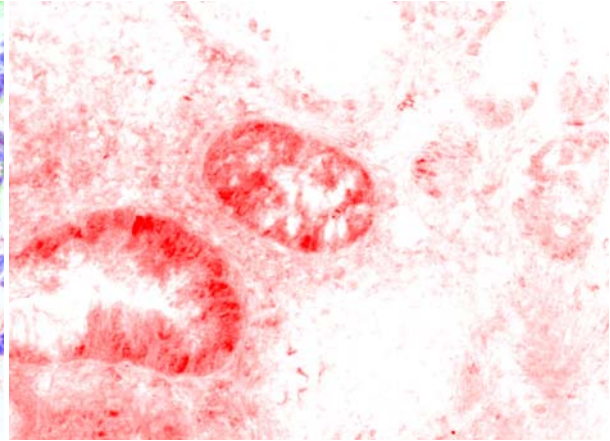
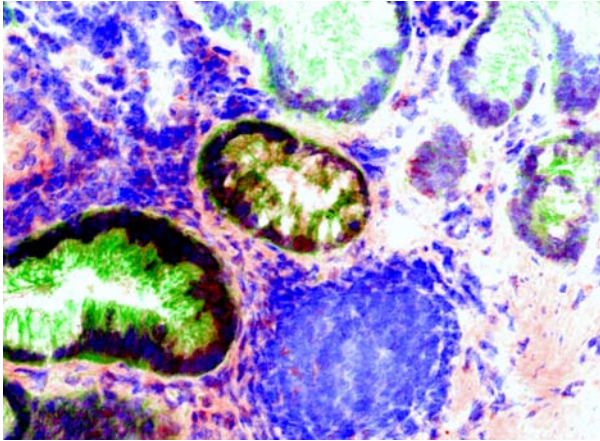


Abb. 4-140.a. Probe Nr. 596, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

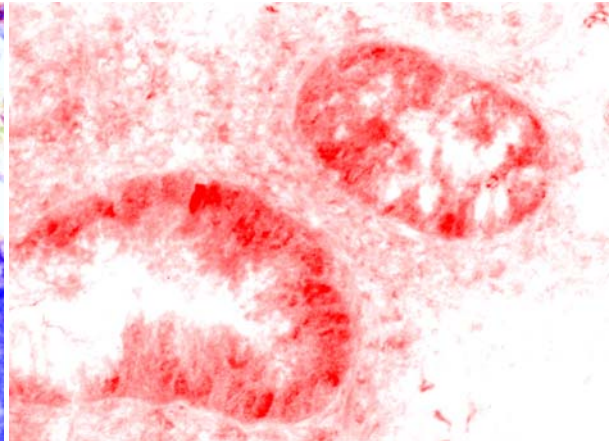
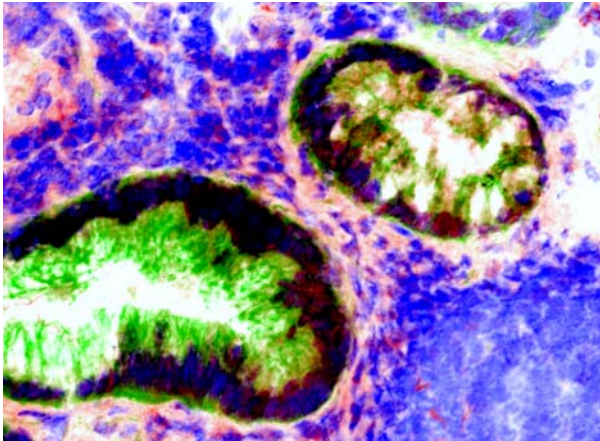


Abb. 4-140.b. Probe Nr. 596, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-140.a. IF-Färbung von p53.

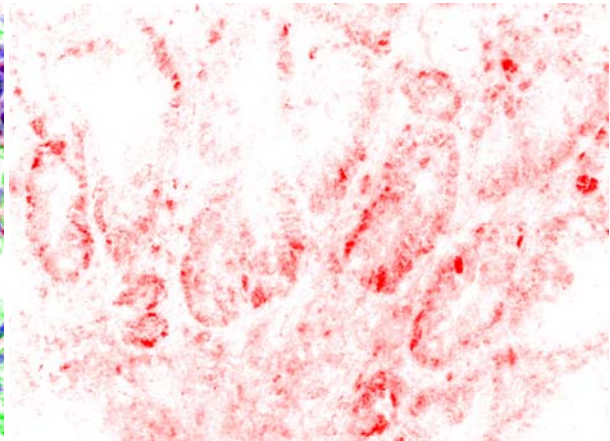
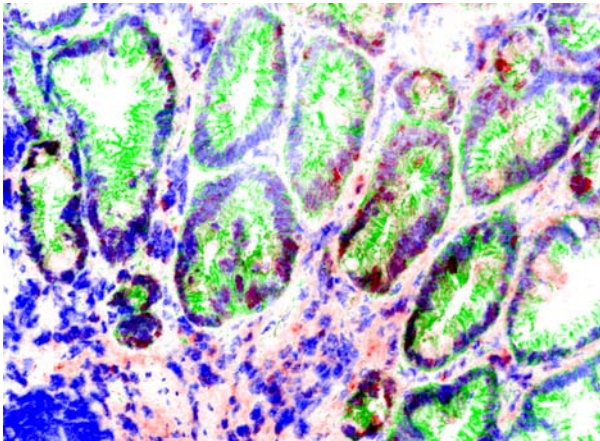


Abb. 4-140.c. Probe Nr. 596, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

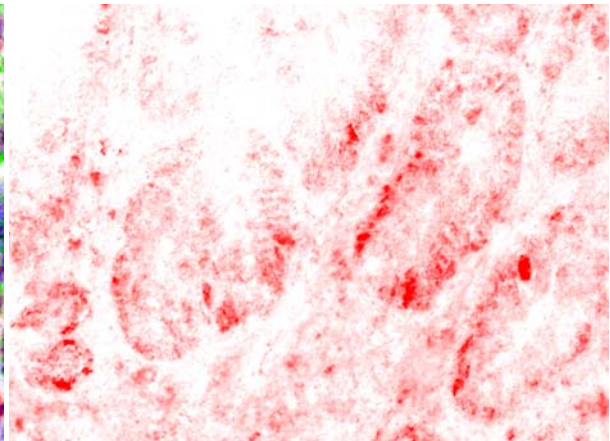
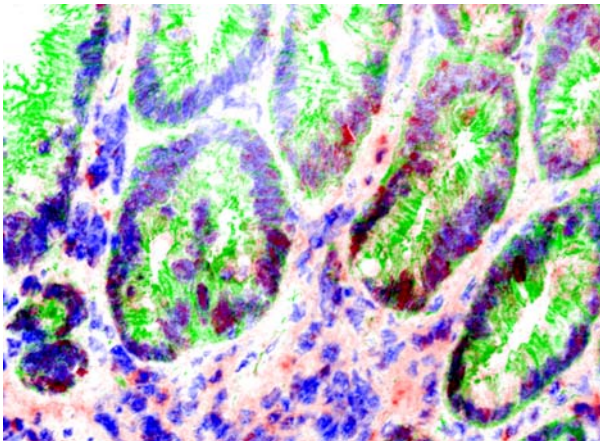


Abb. 4-140.d. Probe Nr. 596, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-140.c. IF-Färbung von p53.

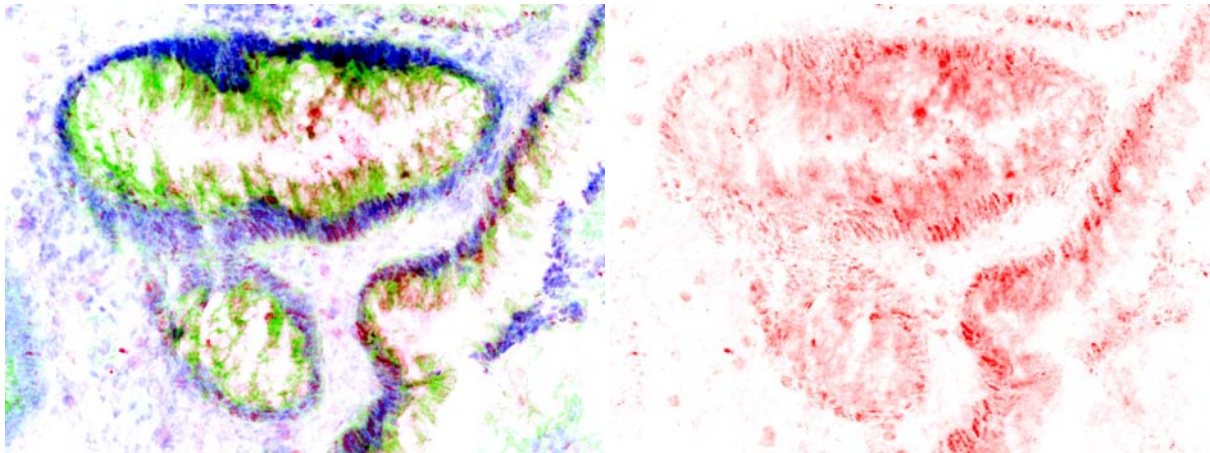


Abb. 4-141. Probe Nr. 568, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

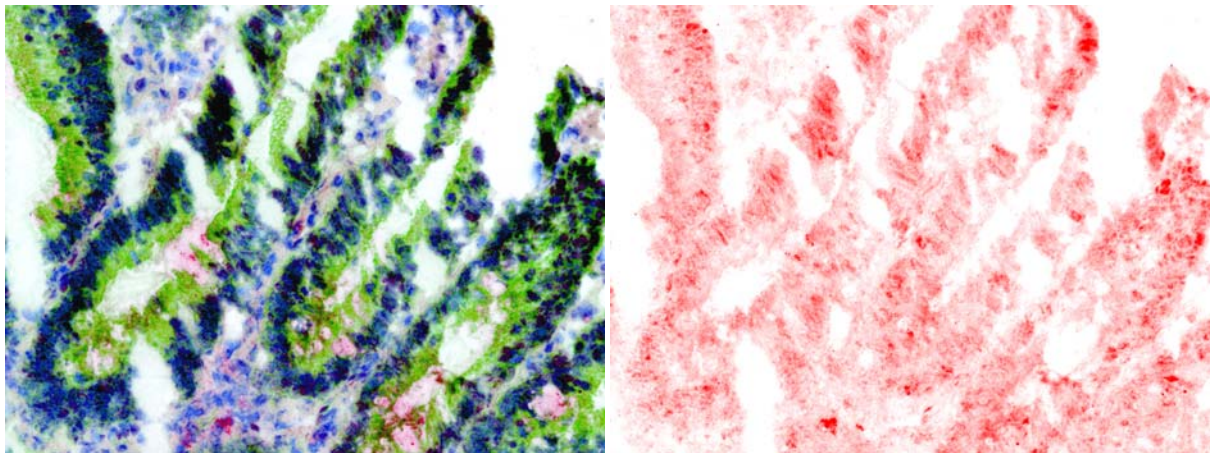


Abb. 4-142. Probe Nr. 545, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-141 bis 4-142: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Polypgewebe von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt. Es ist deutliche p53-Färbung in den Zellkernen der Kryptenepithelzellen vorhanden.

Proben ohne p53-Färbung im Zellkern (Abb. 4-143 bis Abb. 4-147):

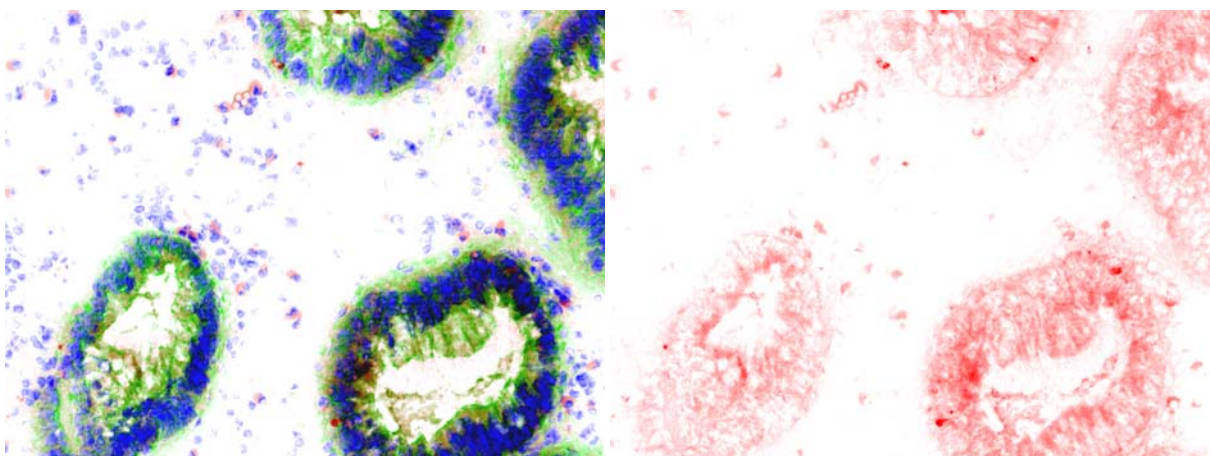


Abb. 4-143. Probe Nr. 598, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-143: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Polypgewebe eines Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt. Es ist keine p53-Färbung in den Zellkernen vorhanden. Es scheint cytoplasmatische p53-Färbung zu geben.

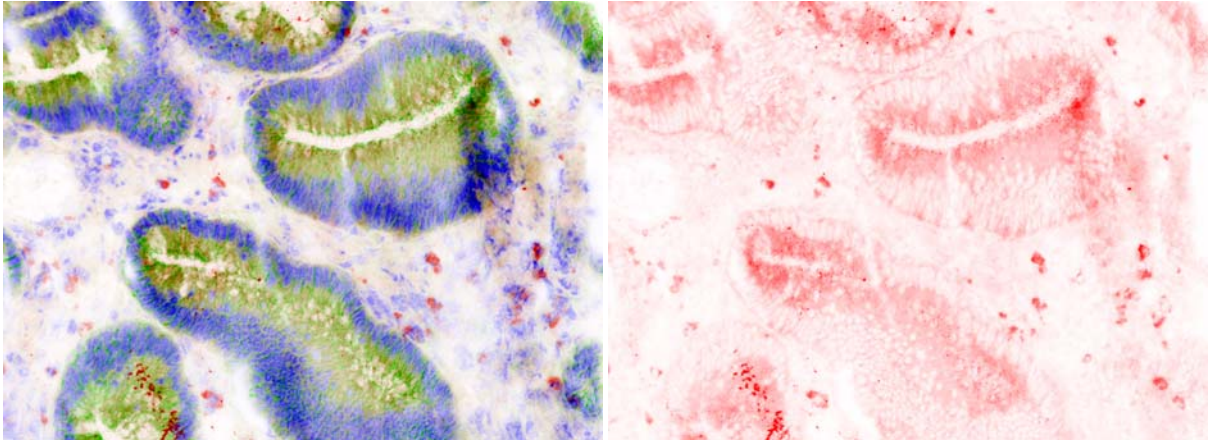


Abb. 4-144.a. Probe Nr. 521, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

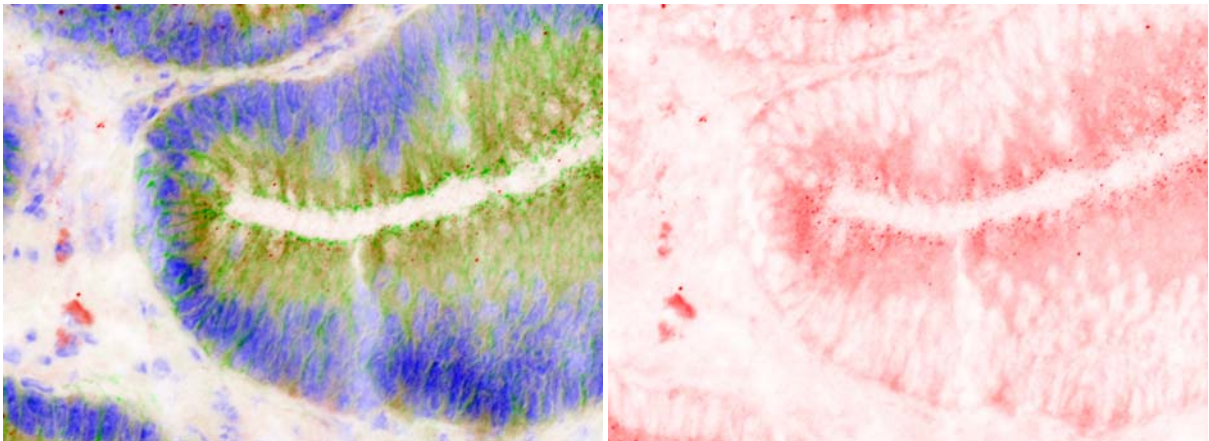


Abb. 4-144.b. Probe Nr. 521, Polyp. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-144.a. IF-Färbung von p53.

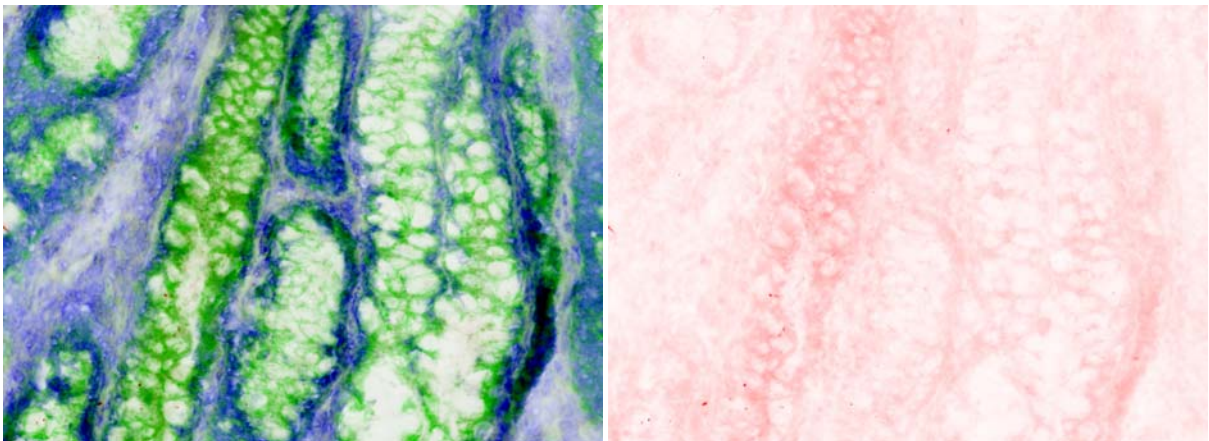


Abb. 4-145. Probe Nr. 613, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

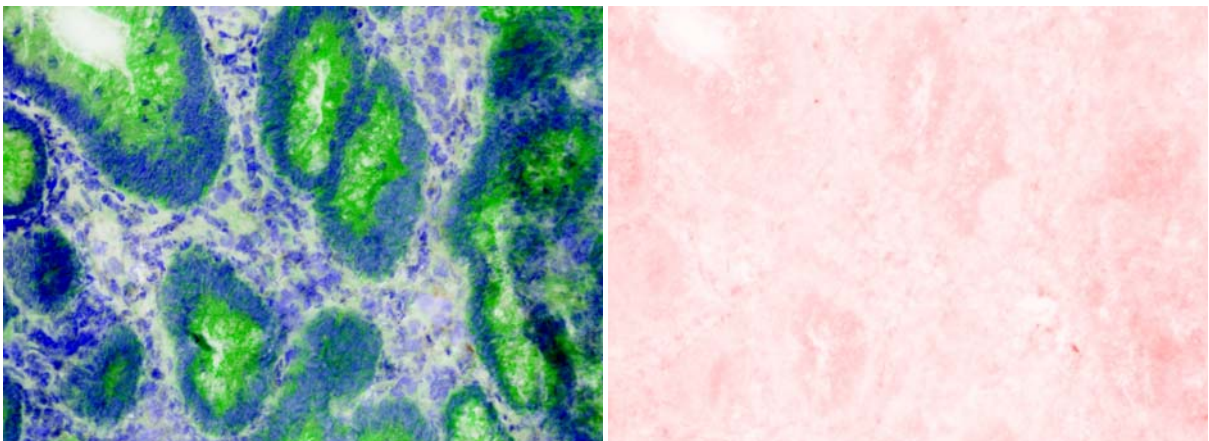


Abb. 4-146. Probe Nr. 615, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

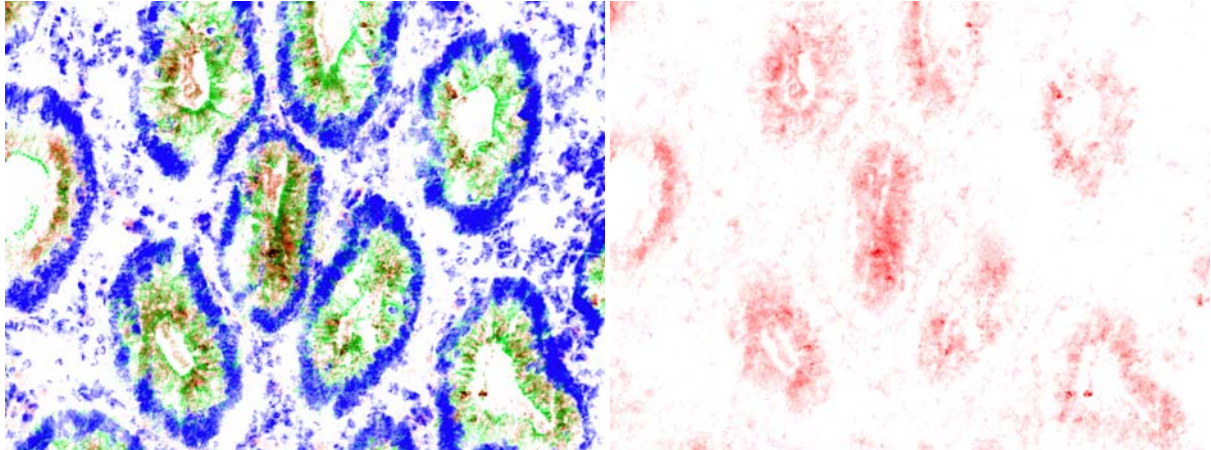


Abb. 4-147. Probe Nr. 553, Polyp. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-138 bis Abb. 4-147:

Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Polypgewebe von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. 4-138 bis 4-142: Es ist p53-Färbung in den Zellkernen der Kryptenepithelzellen vorhanden.

Abb. 4-143 bis 4-147: Es ist keine p53-Färbung in den Zellkernen vorhanden.

Abb. 4-138 bis 4-147: Es scheint cytoplasmatische p53-Färbung vorhanden zu sein.

Abb. 4-138 bis 4-147, rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt.

Bei den zwölf **Tumorproben (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED** ist der Anteil an p53-positiven Proben am höchsten; er beträgt 75% (Abb. 4-148 bis Abb. 4-156). 25% der Tumorproben zeigen keine p53-Zellkernfärbung (Abb. 4-157 bis Abb. 4-159). Die Zellkernfärbung der p53-positiven Proben betrifft ausschließlich die Kryptenepithelzellen.

Proben mit p53-Färbung im Zellkern (Abb. 4-148 bis Abb. 4-156):

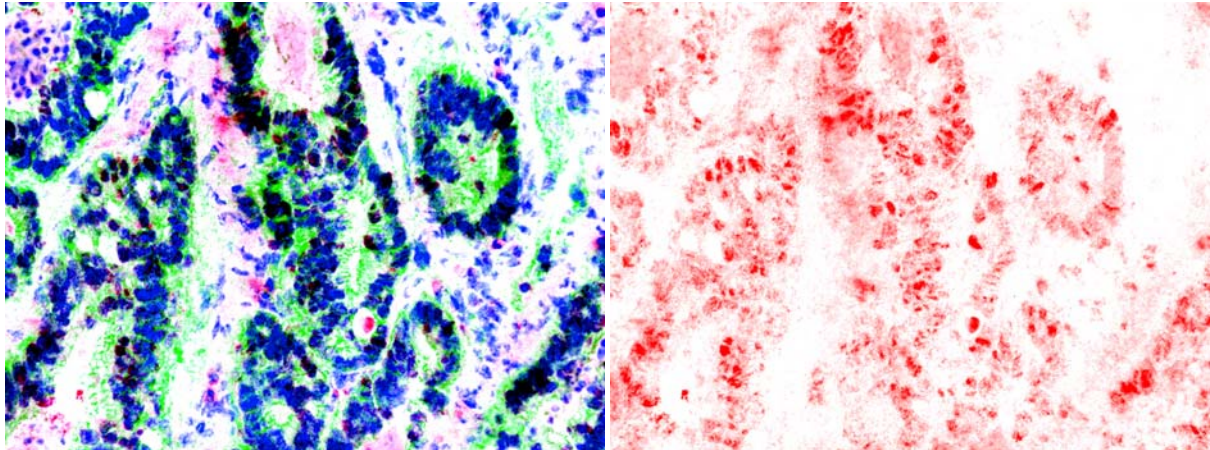


Abb. 4-148.a. Probe Nr. 4163, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

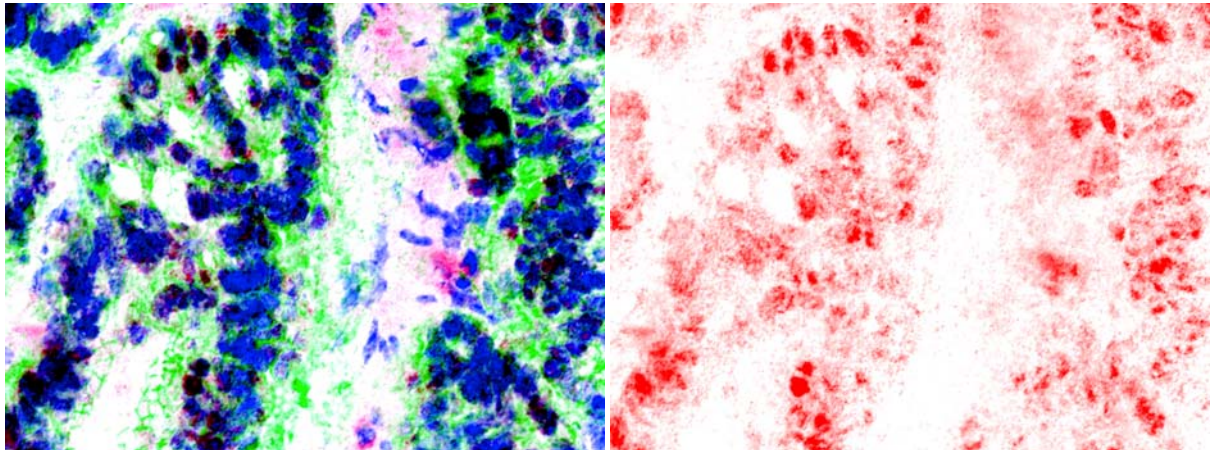


Abb. 4-148.b. Probe Nr. 4163, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-148.a. IF-Färbung von p53.

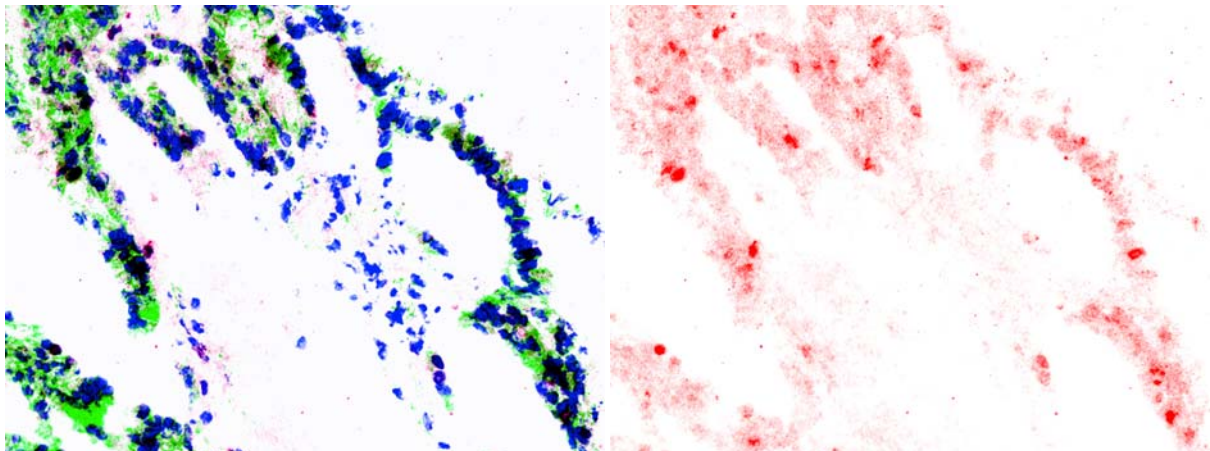


Abb. 4-149. Probe Nr. 4830, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-148 bis 4-149: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt.

Es ist starke p53-Färbung der Zellkerne der Kryptenepithelzellen vorhanden.

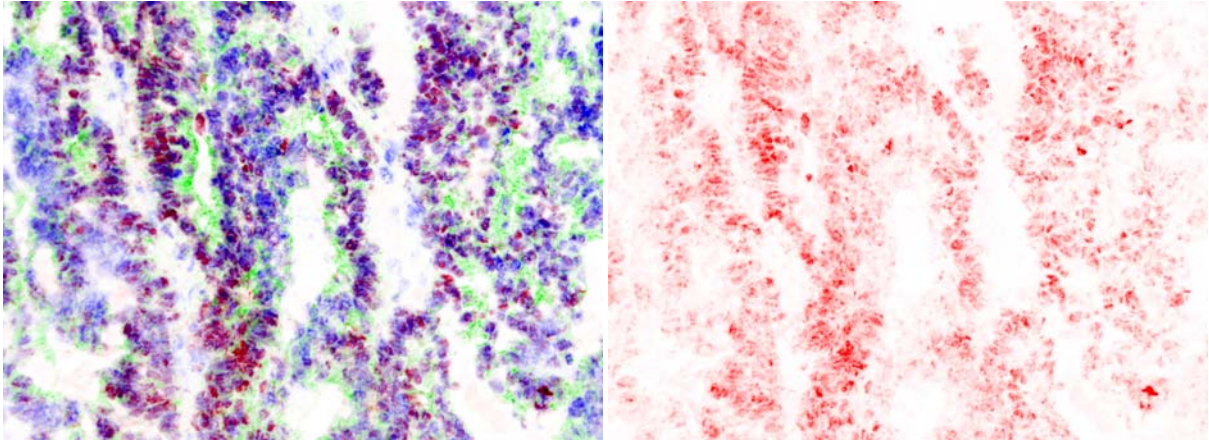


Abb. 4-150.a. Probe Nr. 3033, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

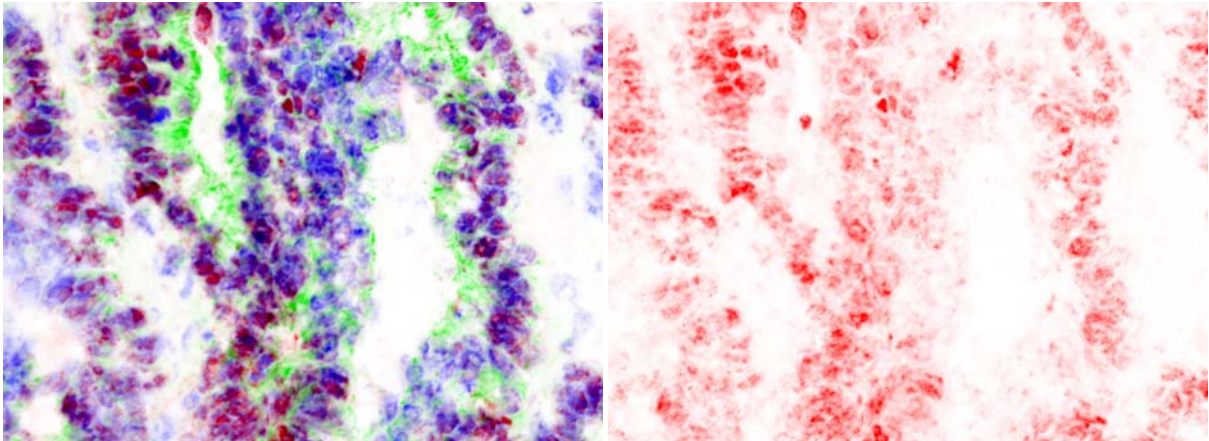


Abb. 4-150.b. Probe Nr. 3033, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-150.a. IF-Färbung von p53.

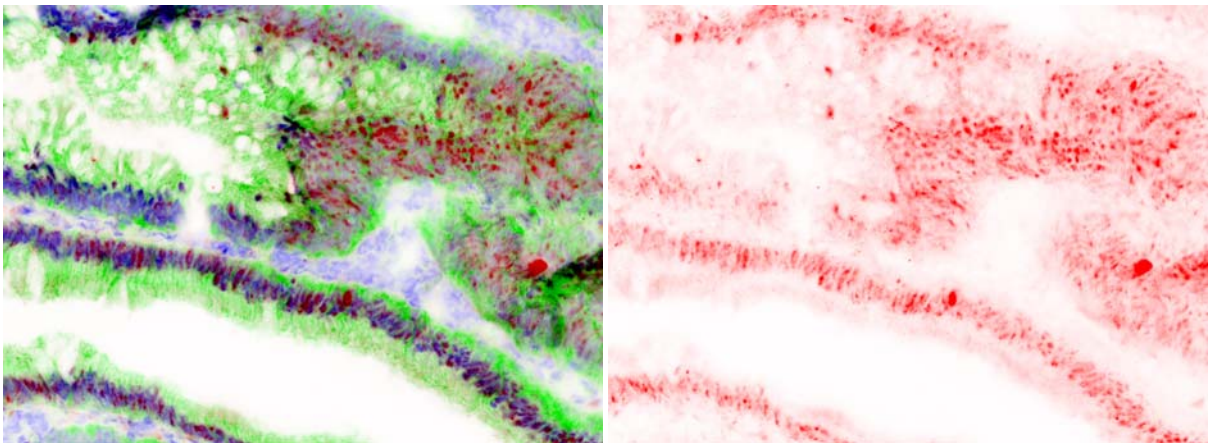


Abb. 4-151.a. Probe Nr. 122, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

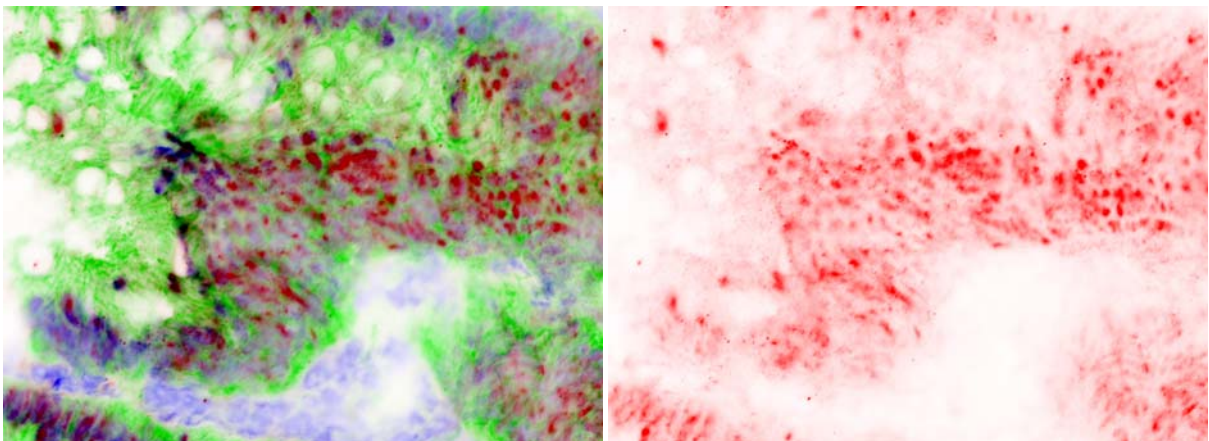


Abb. 4-151.b. Probe Nr. 122, Tumor. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4-151.a. IF-Färbung von p53.

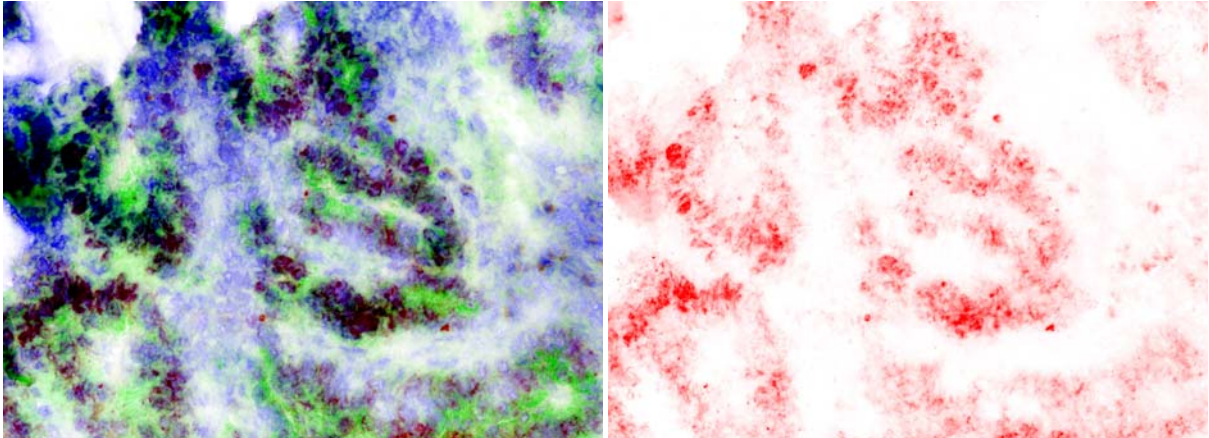


Abb. 4-152. Probe Nr. 7464, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

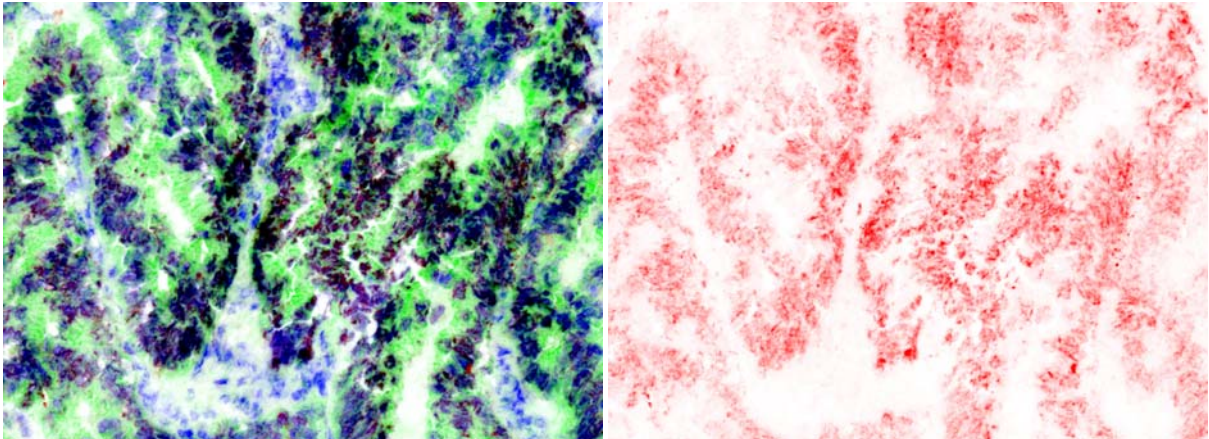


Abb. 4-153. Probe Nr. 6846, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

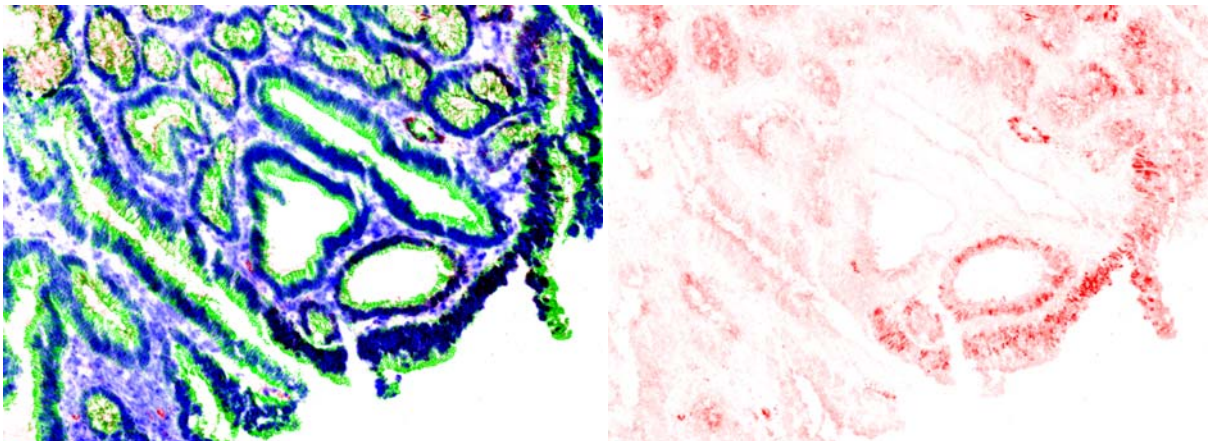


Abb. 4-154.a. Probe Nr. 4642, Tumor. Originalvergrößerung 100 x. IF-Färbung von p53.

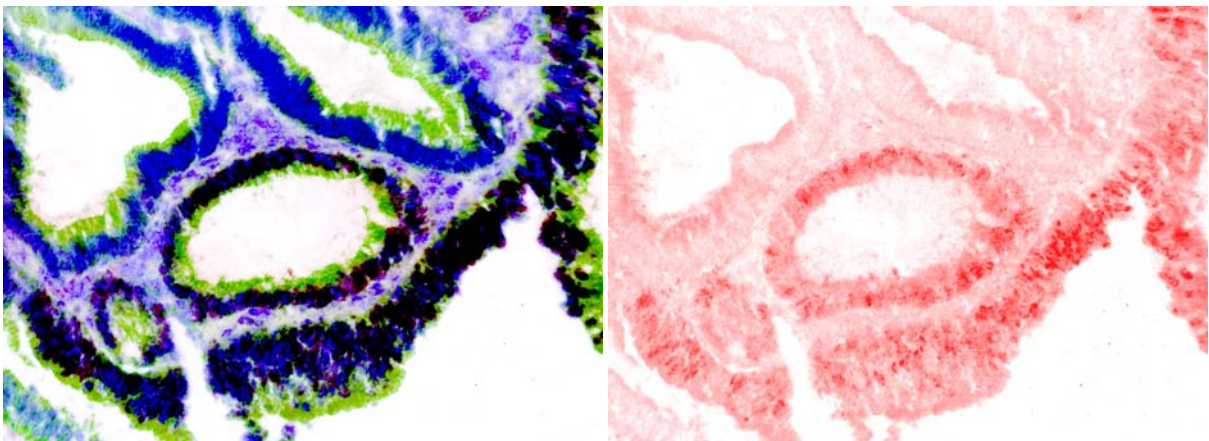


Abb. 4-154.b. Probe Nr. 4642, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

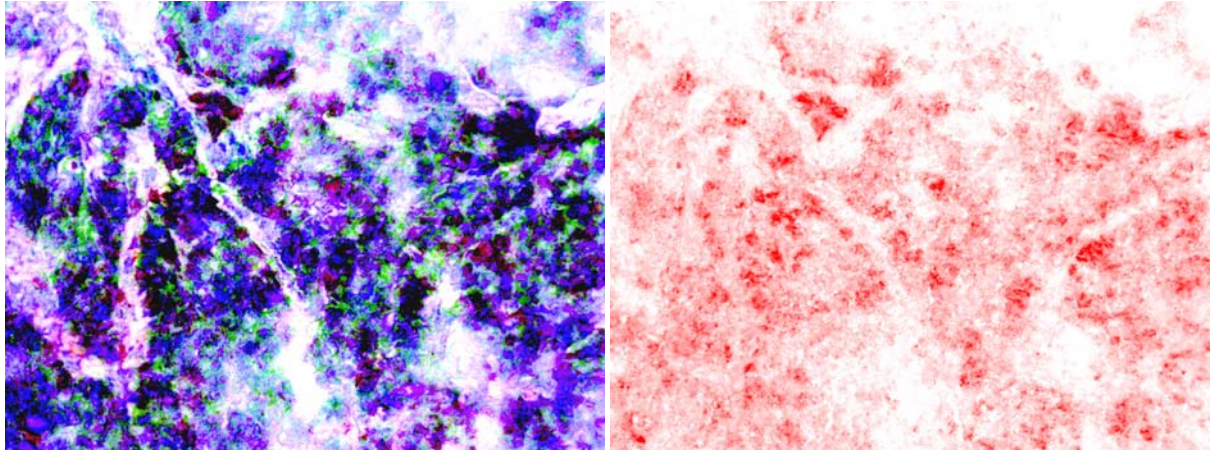


Abb. 4-155. Probe Nr. 2842, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

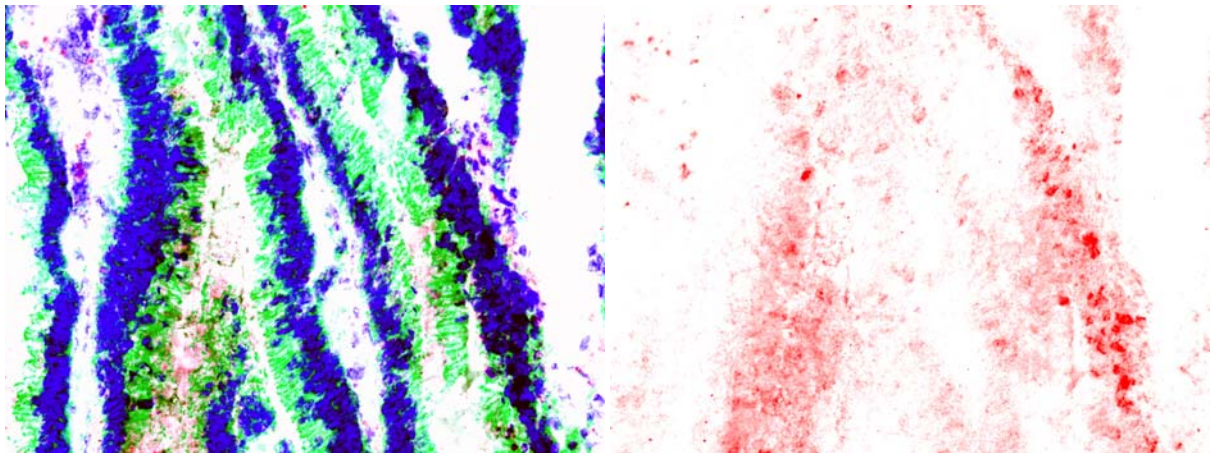


Abb. 4-156. Probe Nr. 4232, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-155 bis 4-156: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Doppelfärbung mit β -Catenin (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt.

Es ist p53-Färbung der Zellkerne der Kryptenepithelzellen vorhanden. Außerdem scheint es cytoplasmatische p53-Färbung zu geben.

Proben ohne p53-Färbung im Zellkern (Abb. 4-157 bis Abb. 4-159):

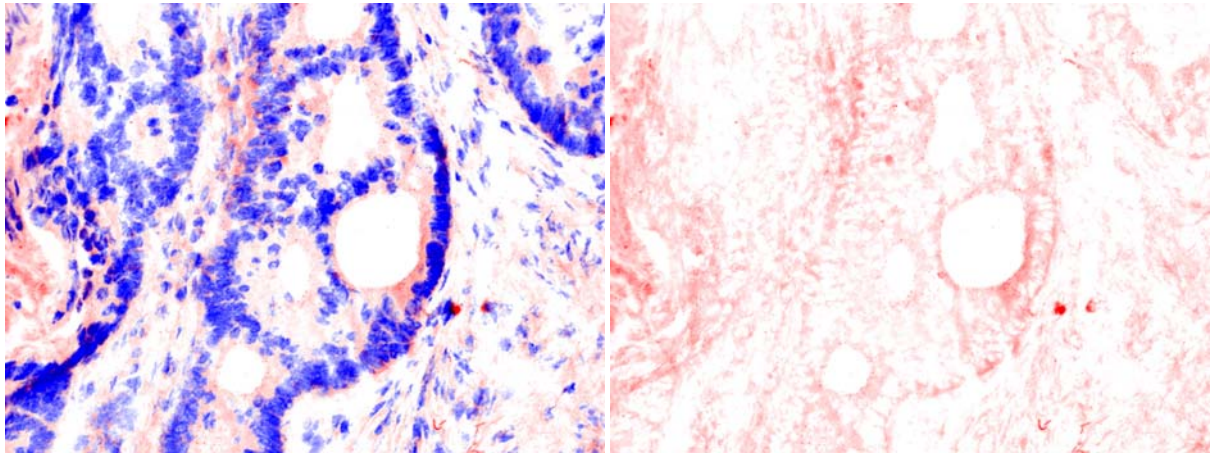


Abb. 4-157.a. Probe Nr. 4236, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

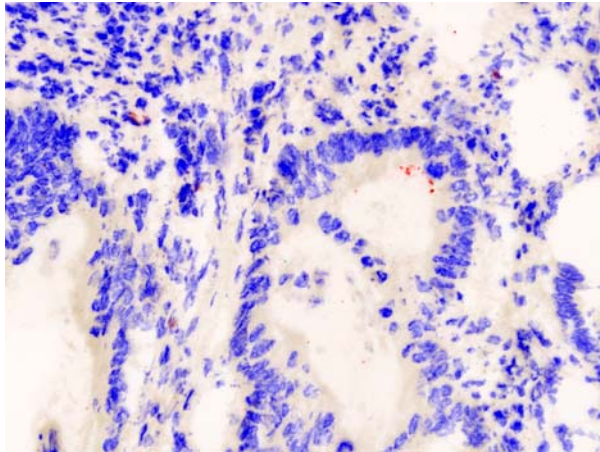


Abb. 4-157.b. Probe Nr. 4236, Tumor. Negativkontrolle. Originalvergrößerung 200 x.

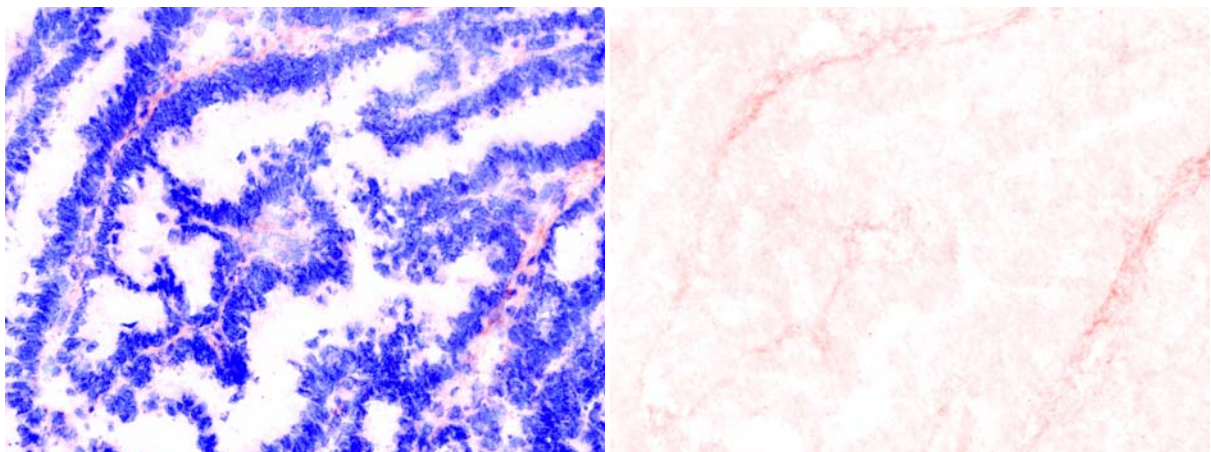


Abb. 4-158. Probe Nr. 6550, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53.

Abb. 4-157 bis 4-158: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt.

Es ist keine p53-Färbung der Zellkerne vorhanden. Es scheint aber cytoplasmatische p53-Färbung zu geben. Die Negativkontrolle (Abb. 4-157.b) zeigt keine cytoplasmatische p53-Färbung und auch keine p53-Färbung im Zellkern.

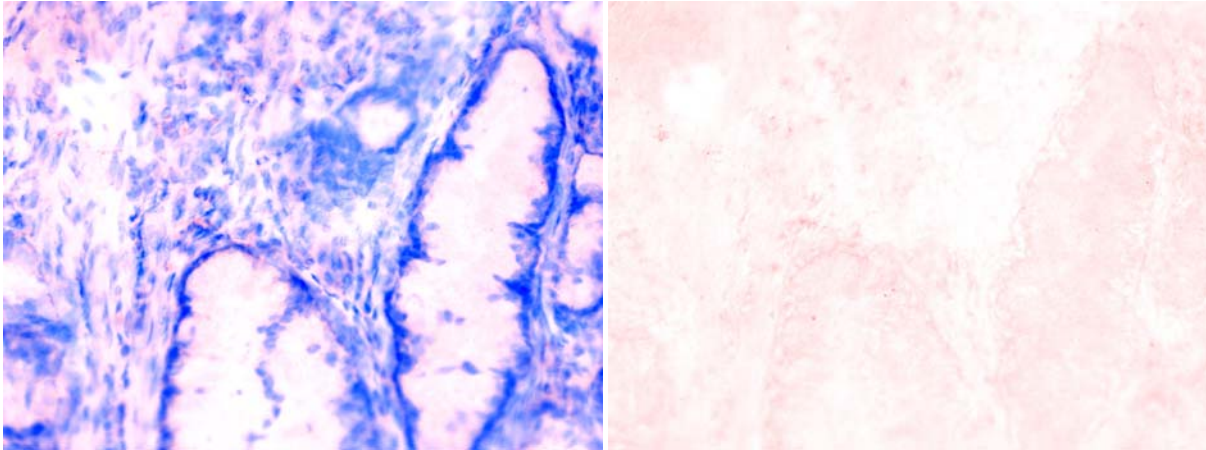


Abb. 4-159. Probe Nr. 10402, Tumor. Originalvergrößerung 200 x. IF-Färbung von p53. Es ist keine p53-Färbung im Zellkern vorhanden.

Abb. 4-148 bis Abb. 4-159:

Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel, Tumorgewebe (Adenokarzinom) von Menschen ohne CED. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Gefrierschnitt.

Abb. 4-148 bis 4-156: Es ist p53-Färbung in den Zellkernen der Kryptenepithelzellen vorhanden.

Abb. 4-157 bis 4-159: Es ist keine p53-Färbung in den Zellkernen vorhanden.

Abb. 4-157.b: Die Negativkontrolle zeigt keine cytoplasmatische p53-Färbung und auch keine p53-Färbung im Zellkern.

Abb. 4-148 bis 4-159: Es scheint cytoplasmatische p53-Färbung vorhanden zu sein.

Abb. 4-148 bis 4-156, links: Doppelfärbung mit β -Catenin (grün).

Abb. 4-148 bis 4-159, rechts: Nur p53-Färbung ist dargestellt.

Zusammenfassend betrachtet liefert die Immunfluoreszenzfärbung von p53 ein klares Ergebnis: Keine der Normalproben zeigt p53-Zellkernfärbung. Von den 20 CED-Proben hat nur eine Probe p53-Färbung im Zellkern. Es handelt sich um eine Polypprobe eines CU-Patienten. Genau 50% der Polypproben und 75% der Tumorproben von Menschen ohne CED sind p53-positiv bezüglich einer Kernfärbung der Kryptenepithelzellen.

Es sind zwei Polypproben von CU-Patienten untersucht worden, damit ist der Anteil an p53-positiven Polypproben der CU-Gruppe ebenfalls 50%.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der einzelnen Proben zeigt Tabelle 2.

Probe Nr.	Bcl-2	Survivin	p53
326 Normal	+ Kryptenbasis	+ Zellk, +Cytopl	-
2842 Normal	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
3033 Normal	+ Kryptenbasis	+ Zellk, +Cytopl	-
4163 Normal	-	- Zellk, +Cytopl	-
4232 Normal	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
4236 Normal	+ Kryptenbasis	+ Zellk, +Cytopl	-
4248 Normal	+ Kryptenbasis, Krypten	- Zellk, +Cytopl	-
4346 Normal	+ Kryptenbasis, Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
4830 Normal	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
10402 Normal	+ Kryptenbasis	+ Zellk, +Cytopl	-
474 CU	+ Krypten	+ Zellk, ++Cytopl	-
475 CU,Pseudopolyp	+ Krypten	-	-
522 CU	-	- Zellk, ++Cytopl	-
523 CU, Polyp	+ Krypten	+ Zellk, ++Cytopl	-
524 CU	+Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
527 CU	+ Kryptenbasis, Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
536 CU,Pseudopolyp	+ Krypten	-	-
544 CU	+ Krypten	- Zellk, +Cytopl	-
552 CED	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
562 CU	-	+ Zellk, +Cytopl	-
566 CU	-	+ Zellk, +Cytopl	-
571 CU	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
574 CU	-	+ Zellk, +Cytopl	-
577 CU	+Krypten	- Zellk, +Cytopl	-
583 CU,Polyp	-	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
584 CU,Pseudopolyp	+ Krypten	+ Zellk, ++Cytopl	-
586 CU,Pseudopolyp	+Krypten	+ Zellk, ++Cytopl	-
595 CU	+Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
608 CU,Pseudopolyp	+ Kryptenbasis, Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
610 CU	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
521 Polyp	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
545 Polyp	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
553Polyp	+Krypten	-	-
568Polyp	+Krypten	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
596 Polyp	-	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
598 Polyp	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
603 Polyp	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
613 Polyp	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
615 Polyp	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
618 Polyp	+ Kryptenbasis	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
122 Tumor	+ Kryptenbasis, Krypten	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
2842 Tumor			+ Zellk
3033 Tumor	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
4163 Tumor	-	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
4232 Tumor	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
4236 Tumor	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
4642 Tumor	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
4830 Tumor	+Krypten	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
6550 Tumor	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-
6846 Tumor	-	+ Zellk, +Cytopl	+ Zellk
7464 Tumor	-	- Zellk, +Cytopl	+ Zellk
10402 Tumor	+ Krypten	+ Zellk, +Cytopl	-

Tabelle 2: Übersicht über die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der einzelnen Proben.

Zeichenerklärung:

- + : Färbung vorhanden
- ++ : starke Färbung vorhanden
- : keine Färbung vorhanden
- + **Kryptenbasis** : Färbung in der Kryptenbasis vorhanden
- + **Krypten** : Färbung in den Krypten vorhanden
- + **Kryptenbasis, Krypten**: Färbung in den Krypten und stärkere Färbung in der Kryptenbasis vorhanden
- + **Zellk** : Färbung im Zellkern der Kryptenepithelzellen vorhanden
- **Zellk** : keine Färbung in den Zellkernen vorhanden
- +**Cytopl** : Färbung im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen vorhanden
- ++**Cytopl** : starke Färbung im Cytoplasma der Kryptenepithelzellen vorhanden

4.2. Untersuchung der Genexpression im Kolonepithel auf RNA-Ebene

Die Genexpression auf RNA-Ebene wird zwischen fünf Gruppen miteinander verglichen: Normales Kolonepithel von Menschen ohne CED (Anzahl der Proben $N = 11$), Kolonepithel von Patienten mit Colitis Ulcerosa ($N = 23$), Kolonepithel von Patienten mit Morbus Crohn ($N = 7$), Kolon-Polypgewebe von Menschen ohne CED ($N = 11$) und Kolon-Tumorgewebe von Patienten ohne CED ($N = 15$).

Die Unterschiede der Stichproben werden nach dem Mann-Whitney-Test (unpaired, two-tail) berechnet. Bei p -Werten $< 0,05$ wird der Unterschied als signifikant betrachtet.

4.2.1. Genexpression von Bcl-2, Survivin und p53 auf RNA-Ebene

Die RNA-Expression von **Bcl-2** (Abb. 4-160.a und 4-160.b) bei den Colitis Ulcerosa-Patienten spaltet sich in zwei Gruppen auf: Bei der einen Gruppe sind die Werte der Bcl-2-Expression stark erhöht gegenüber der Expression in den Normalproben; die andere Gruppe zeigt eine gegenüber den Normalwerten niedrigere Genexpression. Deshalb entsprechen die Werte der CU-Proben nicht einer Normalverteilung. Da die Gruppe mit den gegenüber den Normalproben niedrigeren Werten stärker repräsentiert ist als die Gruppe mit den erhöhten Werten, ist der Median der CU-Gruppe niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe Normalgewebe. Der Unterschied ist aber nicht signifikant.

Die Polyp- und Tumorproben zeigen gegenüber den Normalproben eine insgesamt etwas erhöhte Bcl-2-RNA-Expression, unterscheiden sich jedoch nicht signifikant gegenüber der Normalgruppe. Der Median der Tumorproben ist etwas höher als der der Polypproben. Bei den Polyp- und Tumorproben finden sich die höchsten Extremwerte. Beachtenswert ist, dass die erhöhten Werte der CU-Gruppe sich fast auf derselben Höhe befinden wie die Extremwerte der Polyp- und Tumorgruppe.

Die Bcl-2-Expression in den Morbus Crohn-Proben verhält sich genauso wie in der Untergruppe der CU-Patienten mit niedrigerer Expression; die Mediane liegen auf fast gleicher Höhe.

Die RNA-Expression von **Survivin** (Abb. 4-161.a und 4-161.b) ist bei zwei Proben der Gruppe Colitis Ulcerosa im Vergleich zur Normalgruppe erhöht.

In den Gruppen Polyp und Tumor gibt es stark erhöhte Werte gegenüber den Normalproben. Die Mediane der Gruppen Polyp und Tumor sind um das 11,7-fache bzw. 15,9-fache höher im Vergleich zur Normalgruppe. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen Tumor und Normal ($p < 0,0001$) und zwischen Polyp und Normal ($p = 0,0006$).

Der Median bei Colitis Ulcerosa ist etwas niedriger als bei der Gruppe Normal. Der Unterschied zwischen Tumor und CU ($p < 0,0001$) und Polyp und CU ($p = 0,0002$) ist signifikant. Die p -Werte werden berechnet nach dem Mann-Whitney-Test.

Die Expression von Survivin zeigt in der Gruppe Morbus Crohn etwa dasselbe Verhalten wie in der Gruppe Colitis Ulcerosa, der Median liegt etwas höher. Die MC-Proben weisen im Vergleich zu den Normalproben keine erhöhten Expressionswerte auf. Der Grund kann darin liegen, dass die Stichprobe der MC-Gruppe ($N = 7$) viel kleiner ist als die der CU-Gruppe ($N = 23$).

Die **p53**-RNA-Expression (Abb. 4-162.a und 4-162.b) der Colitis Ulcerosa-Gruppe ist etwas niedriger im Vergleich zur Normalgruppe; der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

In den Polyp- und Tumorproben ist die Expression von p53 gegenüber der Normalgruppe signifikant erhöht (Vergleich Tumor – Normal: $p = 0,0001$ und Vergleich Polyp – Normal: $p = 0,0016$ nach Mann-Whitney-Test). Die p53-Expression in der Tumorgruppe ist außerdem höher als in der Polypgruppe.

Der Median der Gruppe Tumor beträgt das 10,4-fache des Medians der Gruppe Normal. Der Median der Polypgruppe ist um das 7,1-fache höher gegenüber dem der Normalgruppe. Die Gruppe Morbus Crohn verhält sich wie die der Colitis Ulcerosa-Patienten; die Mediane sind fast gleich und liegen beide knapp unter dem der Normalgruppe.

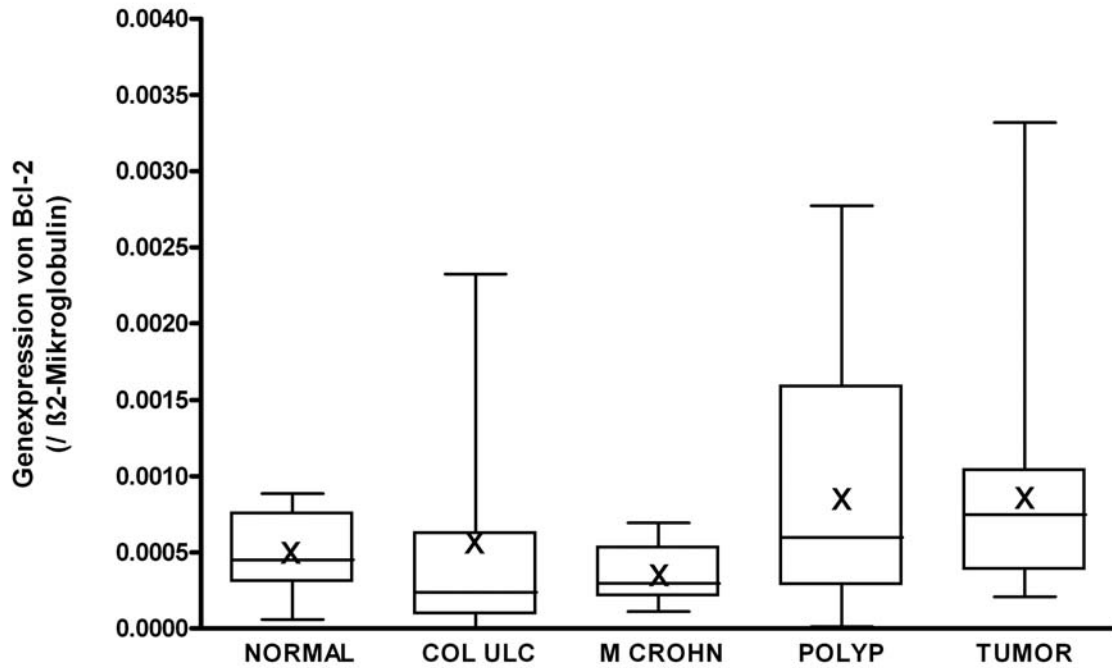


Abb. 4-160.a: RNA-Expression von Bcl-2 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Die RNA-Expression wurde durch Reverse Transkription und nachfolgende Real Time PCR bestimmt. Dabei wurde als Standard das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin gewählt. Graphische Darstellung der Ergebnisse als Box & Whiskers-Plot mit Median (waagerechte Linie) und Mittelwert (Kreuz). Die Box beinhaltet 50% der Werte der Stichprobe. Die Whiskers reichen bis zu den Extremwerten.

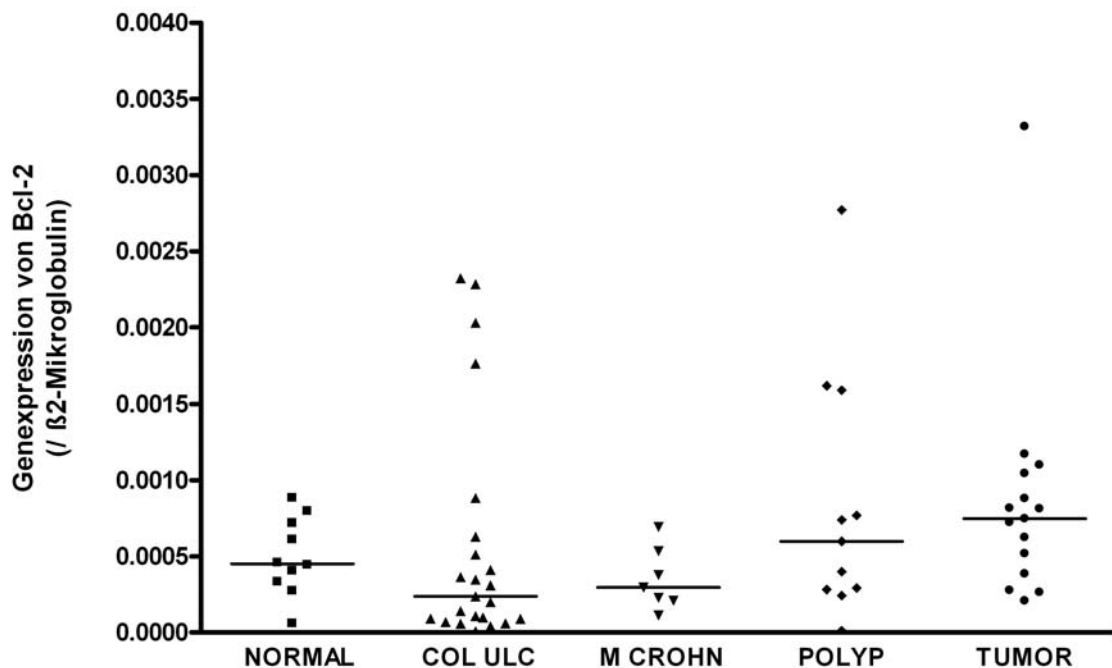


Abb. 4-160.b: RNA-Expression von Bcl-2 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Darstellung von Abb. 4-160.a als Punkte-Diagramm mit Median (waagerechte Linie). Jeder Punkt entspricht einer Probe.

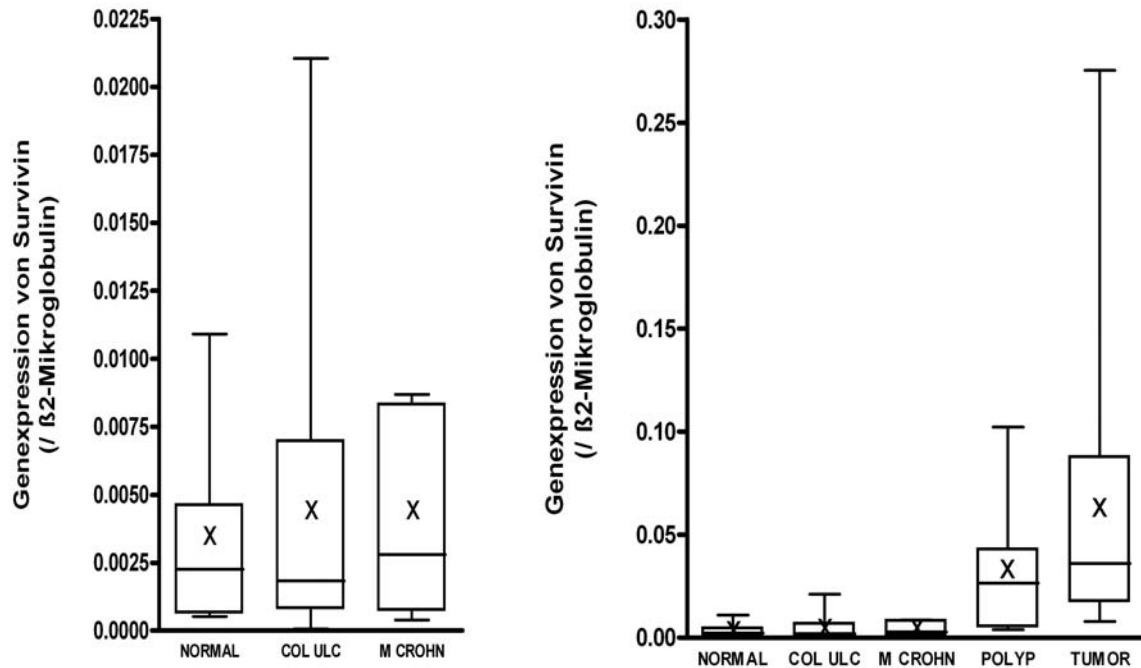


Abb. 4-161.a: RNA-Expression von Survivin im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Die RNA-Expression wurde durch Reverse Transkription und nachfolgende Real Time PCR bestimmt. Dabei wurde als Standard das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin gewählt. Graphische Darstellung der Ergebnisse als Box & Whiskers-Plot mit Median (waagerechte Linie) und Mittelwert (Kreuz). Die Box beinhaltet 50% der Werte der Stichprobe. Die Whiskers reichen bis zu den Extremwerten.

Links: Darstellung der Gruppen Normal, CU und MC.

Rechts: Darstellung aller fünf Gruppen.

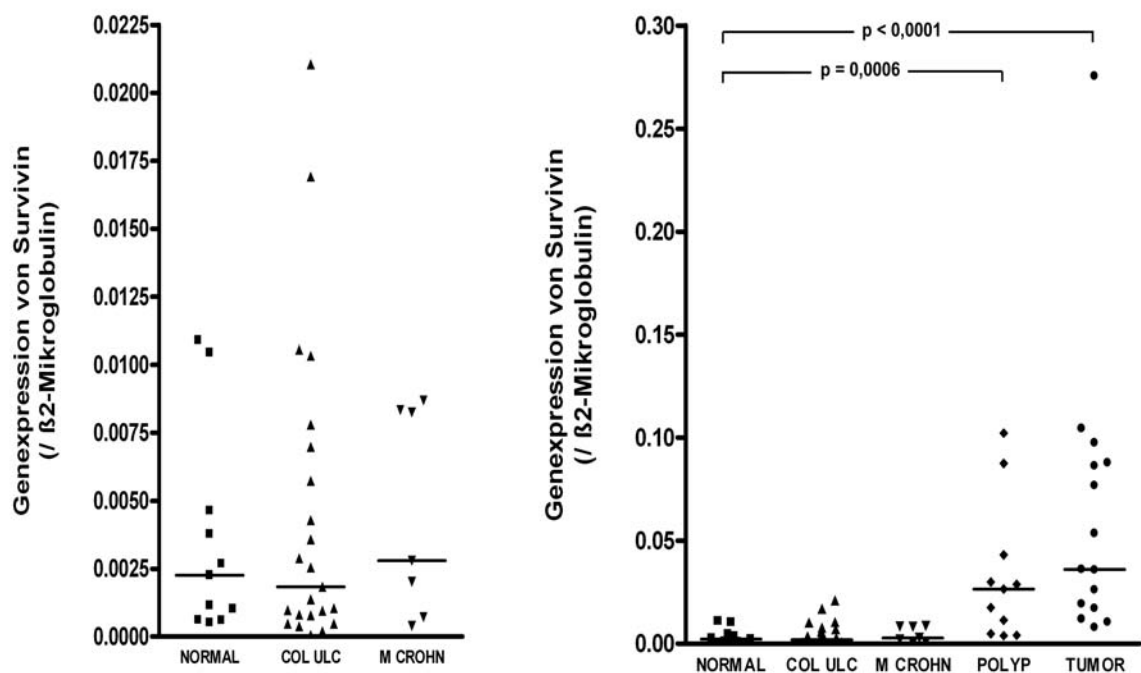


Abb. 4-161.b: RNA-Expression von Survivin im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Darstellung von Abb. 4-161.a als Punkte-Diagramm mit Median (waagerechte Linie). Jeder Punkt entspricht einer Probe. Die p-Werte sind berechnet nach dem Mann-Whitney-Test.

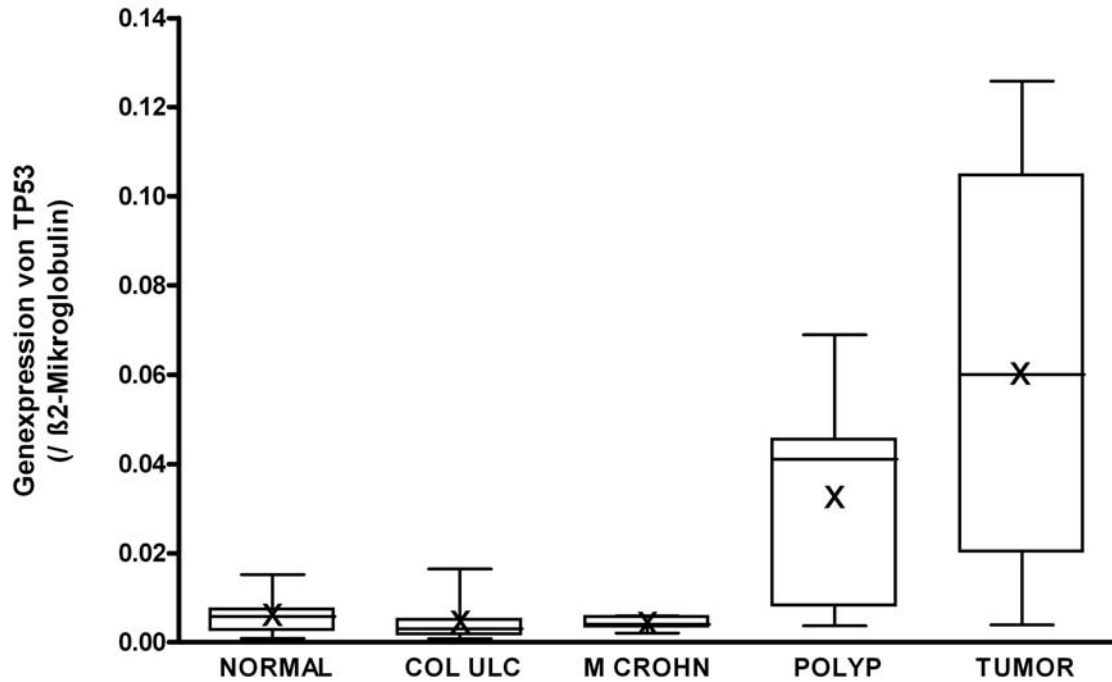


Abb. 4-162.a: RNA-Expression von p53 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Die RNA-Expression wurde durch Reverse Transkription und nachfolgende Real Time PCR bestimmt. Dabei wurde als Standard das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin gewählt. Graphische Darstellung der Ergebnisse als Box & Whiskers-Plot mit Median (waagerechte Linie) und Mittelwert (Kreuz). Die Box beinhaltet 50% der Werte der Stichprobe. Die Whiskers reichen bis zu den Extremwerten.

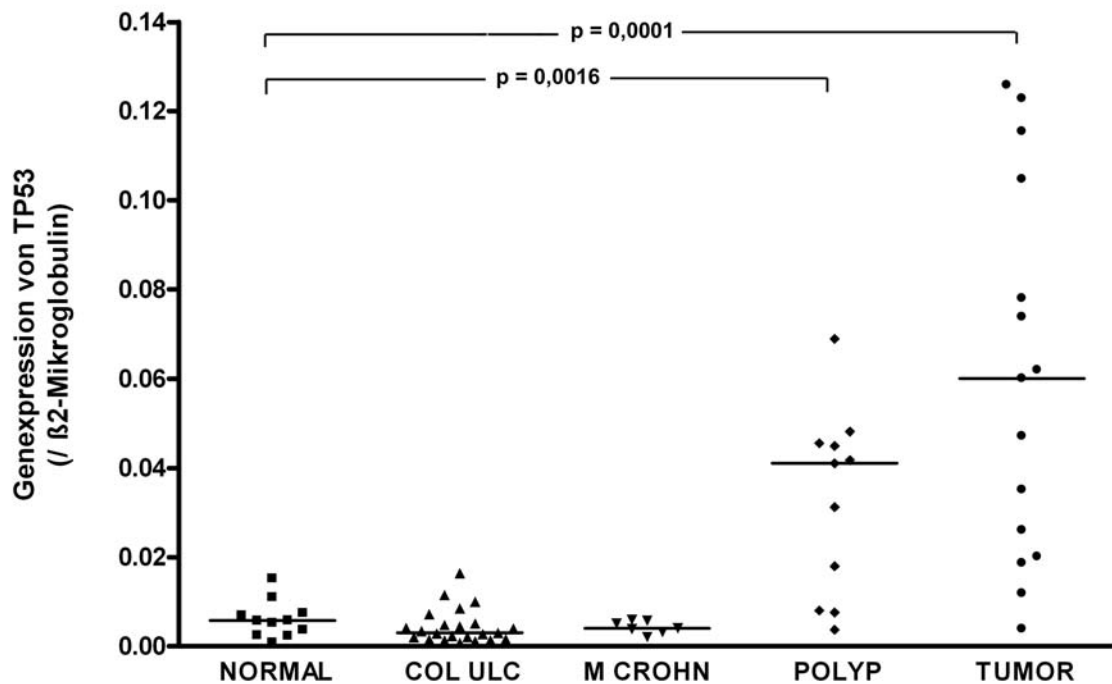


Abb. 4-162.b: RNA-Expression von p53 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Darstellung von Abb. 4-162.a als Punkte-Diagramm mit Median (waagerechte Linie). Jeder Punkt entspricht einer Probe. Die p-Werte sind berechnet nach dem Mann-Whitney-Test.

4.2.2. Genexpression von Musashi-1, IL6, COX-2 und β -Catenin auf RNA-Ebene

Die RNA-Expression von **Musashi-1** (Abb. 4-163.a und 4-163.b) ist in der Gruppe Colitis Ulcerosa signifikant niedriger als in den Gruppen Normal ($p = 0,0123$) und Tumor ($p = 0,0007$). In der Gruppe Tumor ist die RNA-Expression am höchsten; der Median ist um das 2,7-fache höher als in der Normalgruppe. Die Tumorgruppe hat stark erhöhte Extremwerte, doch der Unterschied zur Normalgruppe ist nach Mann-Whitney-Test nicht signifikant ($p = 0,0549$). Die Mediane in den Gruppen Normal, MC und Polyp liegen etwa auf derselben Höhe. Die Gruppen CU und Polyp haben einen bzw. zwei erhöhte Extremwerte.

IL6 zeigt in der Gruppe Tumor die höchste RNA-Expression (Abb. 4-164.a und 4-164.b); es besteht ein signifikanter Unterschied zur Normalgruppe ($p < 0,0001$), zur CU- ($p = 0,0014$), zur MC- ($p = 0,0039$) und Polypgruppe ($p = 0,0002$).

Auch die IL6-Expression der CU-Gruppe ist signifikant höher gegenüber der Normalproben ($p = 0,0245$).

Die Gruppe CU zeigt bezüglich der IL6-RNA-Expression einen stark erhöhten Extremwert. Es handelt sich dabei um die einzige Polypprobe der CU-Gruppe. Dieser Wert ist zwecks einer besseren graphischen Darstellung bei der Gegenüberstellung von Normal, CU, MC und Polyp ausgeschlossen (Abb. 4-164, links). In der graphischen Darstellung von CU und Tumor ist der Extremwert der CU-Gruppe berücksichtigt (Abb. 4-164, rechts).

Die IL6-RNA-Expression der MC-Gruppe entspricht der der CU-Gruppe, die Mediane liegen fast auf gleicher Höhe.

Im Kolon-Normalgewebe von Menschen ohne CED ist IL6 so gut wie gar nicht exprimiert; der Median liegt bei Null.

Die RNA-Expression von **COX-2** (Abb. 4-165.a und 4-165.b) ist in den Gruppen CU ($p = 0,0375$) und Tumor ($p = 0,0379$) signifikant höher im Vergleich zur Normalgruppe. Die Gruppen CU und Tumor haben auch die höchsten Extremwerte.

Die MC-Gruppe hat ebenfalls erhöhte Extremwerte, unterscheidet sich aber nicht signifikant von der Normalgruppe ($p = 0,4151$), wobei zu berücksichtigen ist, dass die Stichprobe der MC-Gruppe sehr viel kleiner ist als die der CU-Gruppe.

Auch die COX-2-RNA-Expression der Polypgruppe ist etwas erhöht aber unterscheidet sich nicht signifikant von der Normalgruppe.

Die RNA-Expression von **β -Catenin** (Abb. 4-166.a und 4-166.b) ist in der Gruppe Tumor stark erhöht und signifikant unterschiedlich zur Normalgruppe ($p < 0,0001$), zur CU-Gruppe ($p < 0,0001$) und zur Polypgruppe ($p = 0,0005$). Der Median beträgt das 9,6-fache des Medians der Normalgruppe.

Auch die RNA-Expression in der Gruppe Polyp ist im Vergleich zur Normalgruppe ($p < 0,0001$) und zur CU-Gruppe ($p < 0,0001$) signifikant höher. Der Median der Polypgruppe beträgt das 2,9-fache des Medians der Normalgruppe.

Die β -Catenin-RNA-Expression in den Gruppen Normal, CU und MC liegt auf etwa gleicher Höhe. Die Gruppen CU und MC weisen im Vergleich zur Normal-Gruppe einige etwas erhöhte Werte auf, wobei der Unterschied nicht signifikant ist ($p = 0,1313$ und $p = 0,1744$).

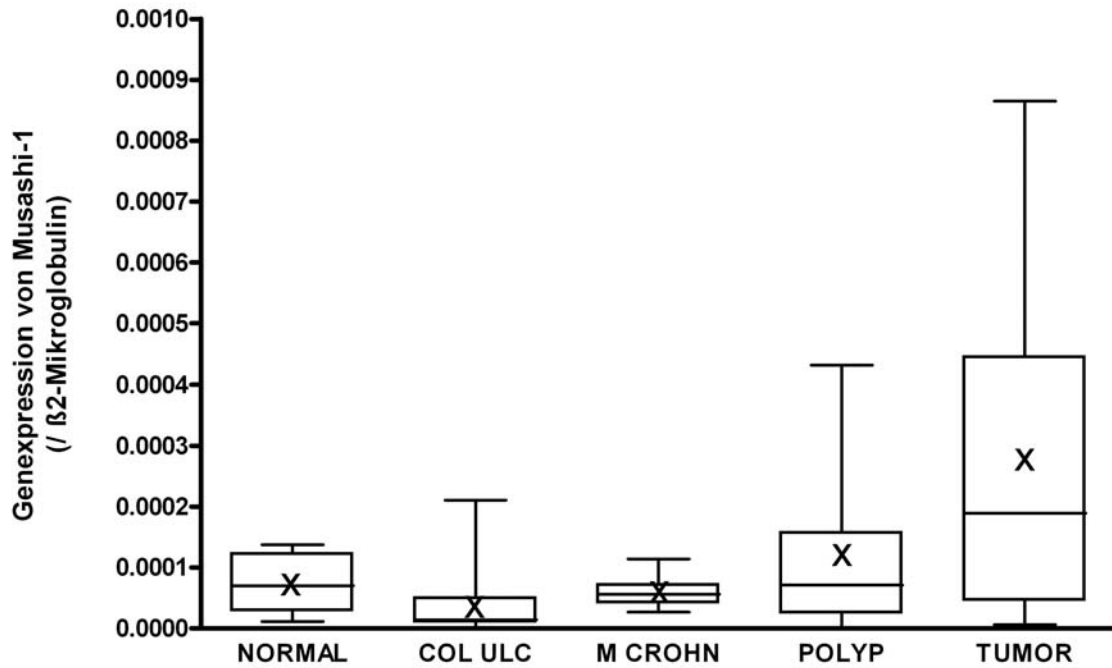


Abb. 4-163.a: RNA-Expression von Musashi-1 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Die RNA-Expression wurde durch Reverse Transkription und nachfolgende Real Time PCR bestimmt. Dabei wurde als Standard das Housekeeping-Gen $\beta 2$ -Mikroglobulin gewählt. Graphische Darstellung der Ergebnisse als Box & Whiskers-Plot mit Median (waagerechte Linie) und Mittelwert (Kreuz). Die Box beinhaltet 50% der Werte der Stichprobe. Die Whiskers reichen bis zu den Extremwerten.

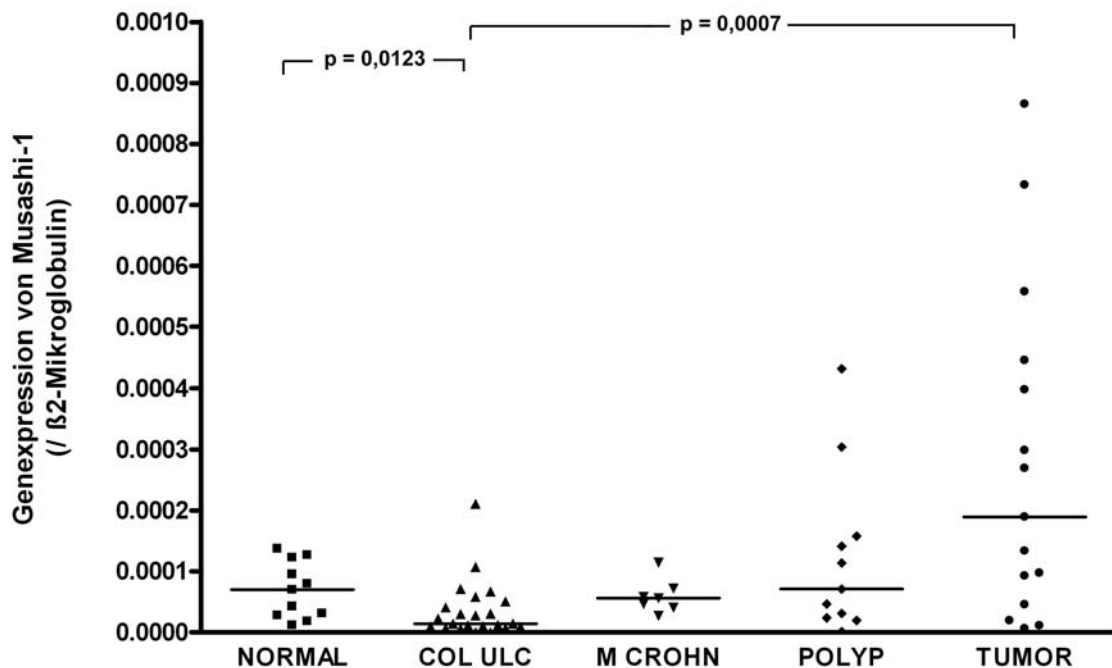


Abb. 4-163.b: RNA-Expression von Musashi-1 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Darstellung von Abb. 4-163.a als Punkte-Diagramm mit Median (waagerechte Linie). Jeder Punkt entspricht einer Probe. Die p-Werte sind berechnet nach dem Mann-Whitney-Test.

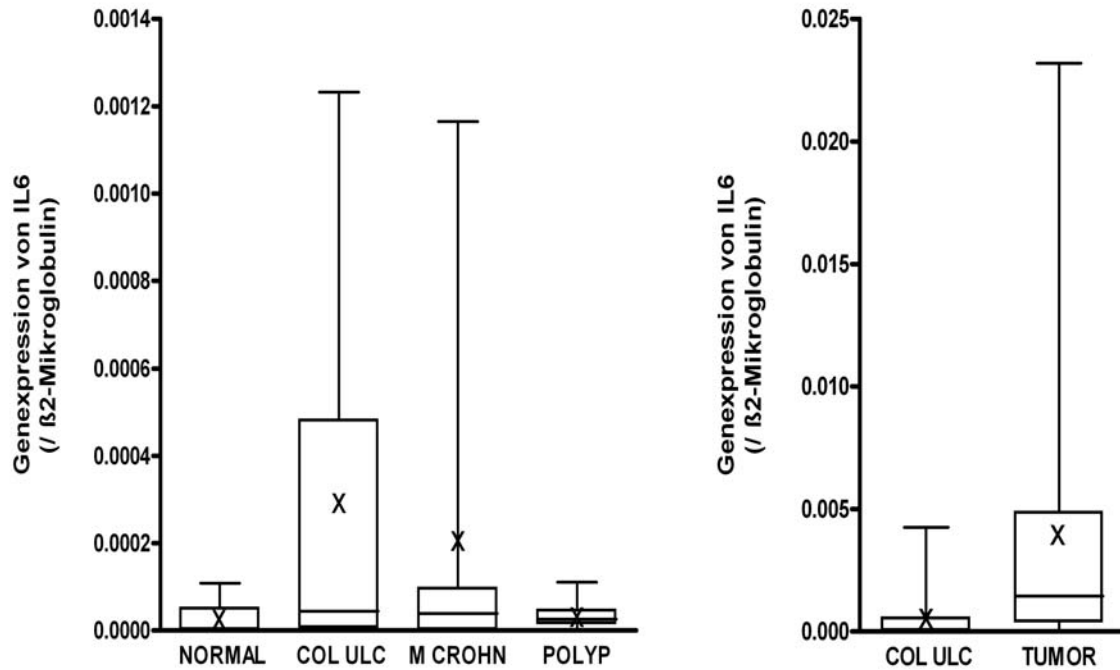


Abb. 4-164.a: RNA-Expression von IL6 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Die RNA-Expression wurde durch Reverse Transkription und nachfolgende Real Time PCR bestimmt. Dabei wurde als Standard das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin gewählt. Graphische Darstellung der Ergebnisse als Box & Whiskers-Plot mit Median (waagerechte Linie) und Mittelwert (Kreuz). Die Box beinhaltet 50% der Werte der Stichprobe. Die Whiskers reichen bis zu den Extremwerten.

Links: Darstellung ohne Gruppe Tumor. Stark erhöhter Extremwert der einzigen Polypprobe der Gruppe CU ist ausgeschlossen.

Rechts: Gegenüberstellung von Gruppe Colitis Ulcerosa und Gruppe Tumor. Der Extremwert der Polypprobe eines CU-Patienten in der Gruppe CU ist berücksichtigt.

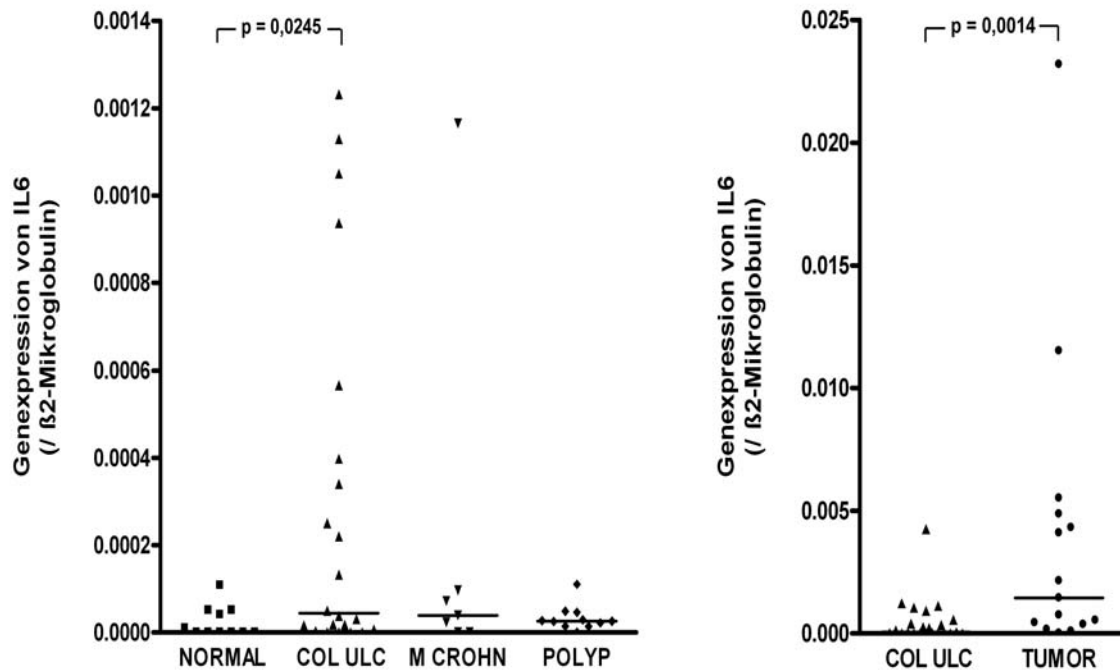


Abb. 4-164.b: RNA-Expression von IL6 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Darstellung von Abb. 4-164.a als Punkte-Diagramm mit Median (waagerechte Linie). Jeder Punkt entspricht einer Probe. Die p-Werte sind berechnet nach dem Mann-Whitney-Test.

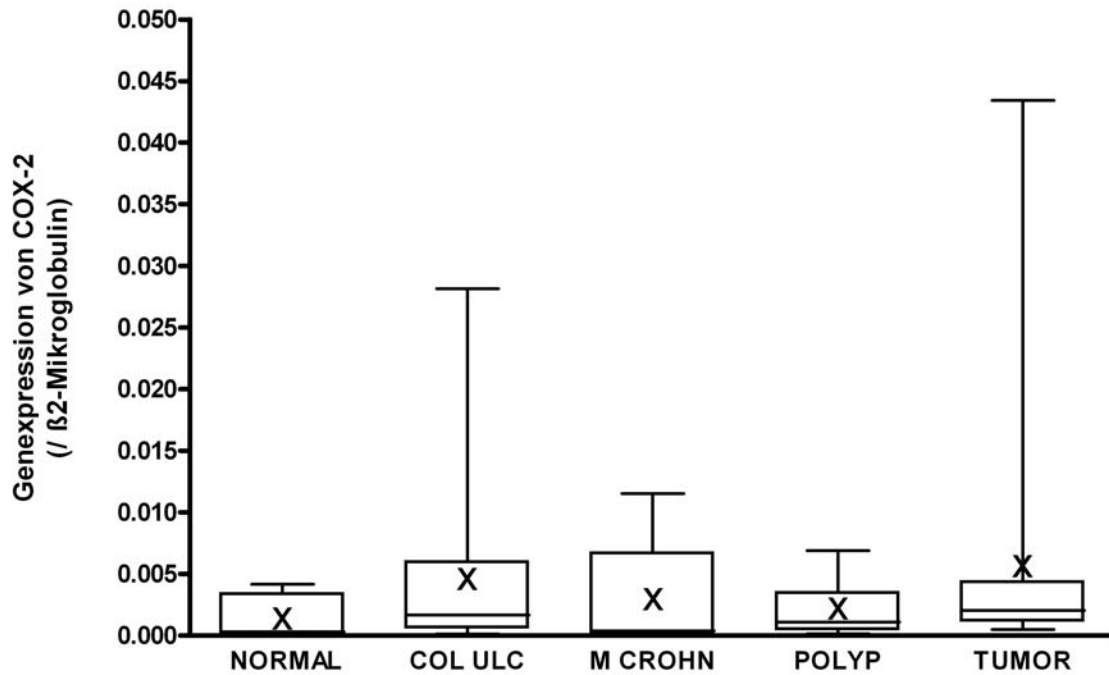


Abb. 4-165.a: RNA-Expression von COX-2 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Die RNA-Expression wurde durch Reverse Transkription und nachfolgende Real Time PCR bestimmt. Dabei wurde als Standard das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin gewählt. Graphische Darstellung der Ergebnisse als Box & Whiskers-Plot mit Median (waagerechte Linie) und Mittelwert (Kreuz). Die Box beinhaltet 50% der Werte der Stichprobe. Die Whiskers reichen bis zu den Extremwerten.

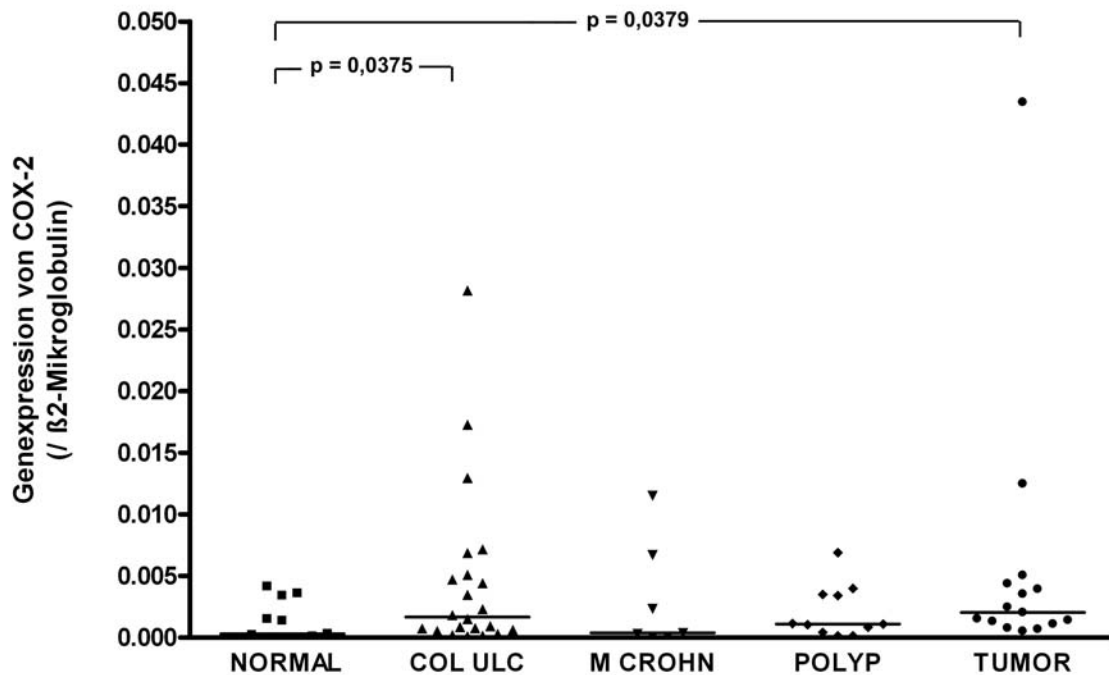


Abb. 4-165.b: RNA-Expression von COX-2 im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Darstellung von Abb. 4-165.a als Punkte-Diagramm mit Median (waagerechte Linie). Jeder Punkt entspricht einer Probe. Die p-Werte sind berechnet nach dem Mann-Whitney-Test.

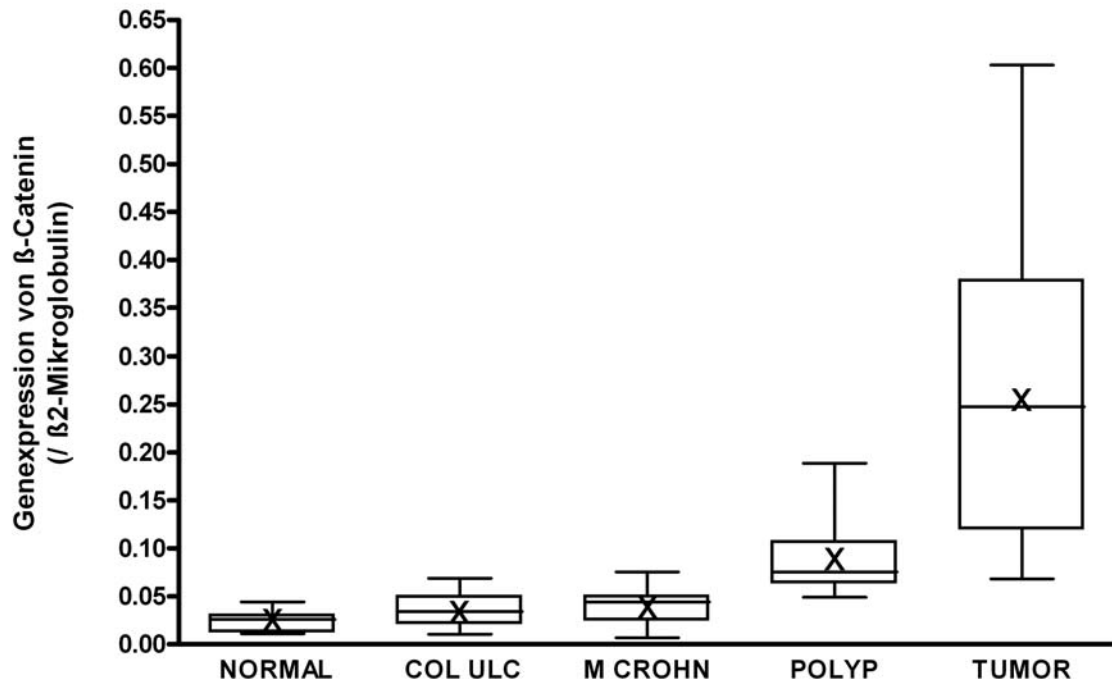


Abb. 4-166.a: RNA-Expression von β -Catenin im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Die RNA-Expression wurde durch Reverse Transkription und nachfolgende Real Time PCR bestimmt. Dabei wurde als Standard das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin gewählt. Graphische Darstellung der Ergebnisse als Box & Whiskers-Plot mit Median (waagerechte Linie) und Mittelwert (Kreuz). Die Box beinhaltet 50% der Werte der Stichprobe. Die Whiskers reichen bis zu den Extremwerten.

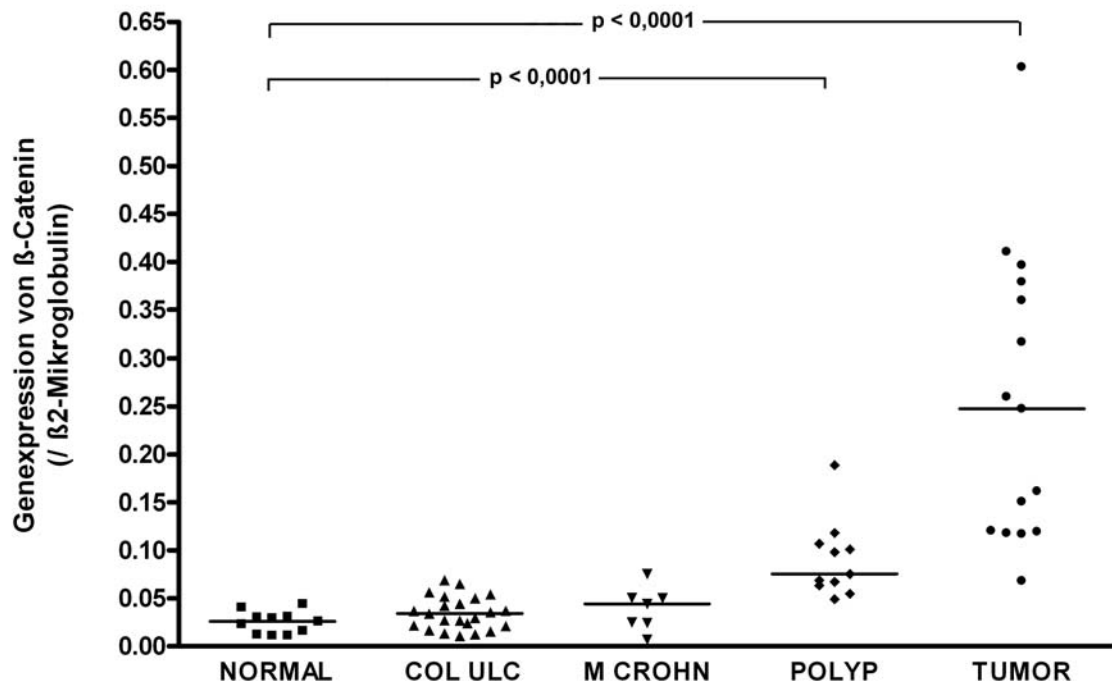


Abb. 4-166.b: RNA-Expression von β -Catenin im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED, im Kolonepithel von CU- und MC-Patienten, im Kolon-Polyp- und im Kolon-Tumorgewebe von Menschen ohne CED. Darstellung von Abb. 4-166.a als Punkte-Diagramm mit Median (waagerechte Linie). Jeder Punkt entspricht einer Probe. Die p-Werte sind berechnet nach dem Mann-Whitney-Test.

5. Diskussion

Das Risiko der Entstehung eines Tumors bei Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darm-erkrankung wird als hoch eingeschätzt, wenn dysplastische Veränderungen oder Polypen des Darmepithels vorhanden sind. Um das Auftreten eines Tumors zu verhindern, werden diese entfernt und manchmal wird in solchen Fällen eine Kolektomie der betroffenen Darm-region in Betracht gezogen und durchgeführt.¹²⁶ Ein Problem ist, dass die Dysplasien und Vorstufen von Tumoren nicht immer rechtzeitig entdeckt werden. In wenigen Fällen verläuft die CED-bedingte Tumorentstehung nicht über die Dysplasie.¹³⁰

Um schon möglichst frühzeitig, noch vor Entstehen einer Dysplasie ein Tumorrisiko erkennen zu können, wird nach Markern gesucht, die im Kolonepithel von CED-Patienten eine Tumorgefahr anzeigen. Dazu ist es hilfreich, mehr Erkenntnisse über den Mechanismus der CED-bedingten Tumorentstehung zu gewinnen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit normales Kolonepithel, von einer CED betroffenes Kolonepithel, Kolonpolypen und Kolontumorgewebe bezüglich der RNA- und Proteinexpression von Bcl-2, Survivin und p53 und der RNA-Expression von Musashi-1, IL6, COX-2 und β -Catenin miteinander verglichen.

Dazu wurde die hochempfindliche Methode der Real Time PCR gewählt und die Immunfluoreszenzfärbung. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung wurden bei einem Teil der Proben zusätzlich abgesichert durch die Methode der Peroxidasefärbung. Es stellte sich heraus, dass die Methode der Immunfluoreszenzfärbung eine höhere Auflösung zeigte und ein besseres Ergebnis lieferte als die POD-Färbung. Dies war zu erwarten, da bei der IF-Färbung die Farbreaktion auf fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern beruht, während es sich bei der Farbreaktion der POD-Färbung um eine chemische Reaktion handelt. Außerdem hat die IF-Färbung den Vorteil, dass eine Doppelfärbung mit zwei Antikörpern möglich ist und dass sich die Färbung in den einzelnen Kanälen getrennt darstellen lässt.

Was das Probenmaterial betrifft, muss berücksichtigt werden, dass es sich um menschliches Gewebe von verschiedenen Patienten handelt und individuelle Unterschiede für eine gewisse Inhomogenität innerhalb der Untersuchungsgruppen sorgen können. Diese können genetisch bedingt sein; zum Beispiel kann es Unterschiede im Immunsystem geben, was Auswirkungen auf den Verlauf der CED haben kann bei den Colitis Ulcerosa (CU)- und Morbus Crohn (MC)-Patienten. Aber auch äußere Faktoren spielen eine Rolle, wie zum Beispiel Ernährung und Lebensweise. Das Alter der Personen ist unterschiedlich und der gesundheitliche Allgemeinzustand. Manche Patienten haben eine langjährige CED, bei anderen ist die CED erst vor kurzem festgestellt worden, außerdem können verschiedene Regionen des Kolons betroffen sein. Einige CED-Patienten wurden mit entzündungshemmenden Medikamenten behandelt, die das Erscheinungsbild der Krankheit beeinflussen. Die CED-Proben stammen von Patienten, die zum Zeitpunkt der Entnahme einen akuten Schub hatten oder bei denen sich die Entzündung in Remission befand. Daher stammt das Probenmaterial sowohl von entzündlichen wie auch von regenerierten Bereichen des Kolonepithels.

Unter den CU-Proben befinden sich auch Polypen und Pseudopolypen. Es zeigte sich, dass sich die Pseudopolypen genauso wie die anderen CU-Proben verhielten. Eine der beiden untersuchten Polypenproben der CU-Patienten lieferte jedoch andere Ergebnisse als die anderen CU-Proben. Als einzige Probe der CU-Gruppe zeigte sie p53-Zellkernfärbung der Kryptenepithelzellen (siehe Seite 87) und sie war die einzige Probe der CU-Gruppe mit extrem hohem IL6-mRNA-Gehalt (siehe Abb. 4-164, rechts). Das unterschiedliche Verhalten der Polyp- und Pseudopolypenproben lässt sich damit erklären, dass Pseudopolypen durch Reparaturprozesse entzündlicher Bereiche entstehen, wogegen Polypen eine Folge übermäßiger Proliferation sind.

Der CU-Gruppe wurde die größte Bedeutung beigemessen; in dieser Gruppe wurde die größte Anzahl an Proben untersucht. Es stellt eine wichtige Gruppe dar, da versucht werden soll, die frühen Ereignisse auf dem Weg zur Tumorentstehung aufzudecken, die im Kolon-epithel von CU-Patienten noch vor Entstehen einer Dysplasie oder eines Adenoms eintreten.

Bezüglich der **Proteinexpression von Bcl-2** im Kolonepithel ist in den vier Untersuchungsgruppen Normal, CU, Polyp und Tumor kein wesentlicher Unterschied festzustellen (siehe Kapitel 4.1.1. und Abb. 5-1). Die CU- und Tumor-Gruppe hat bei der Immunfluoreszenzfärbung einen etwas höheren Anteil an Bcl-2-negativen Proben (ca. 25%) als die Normal- und Polypgruppe (10%).

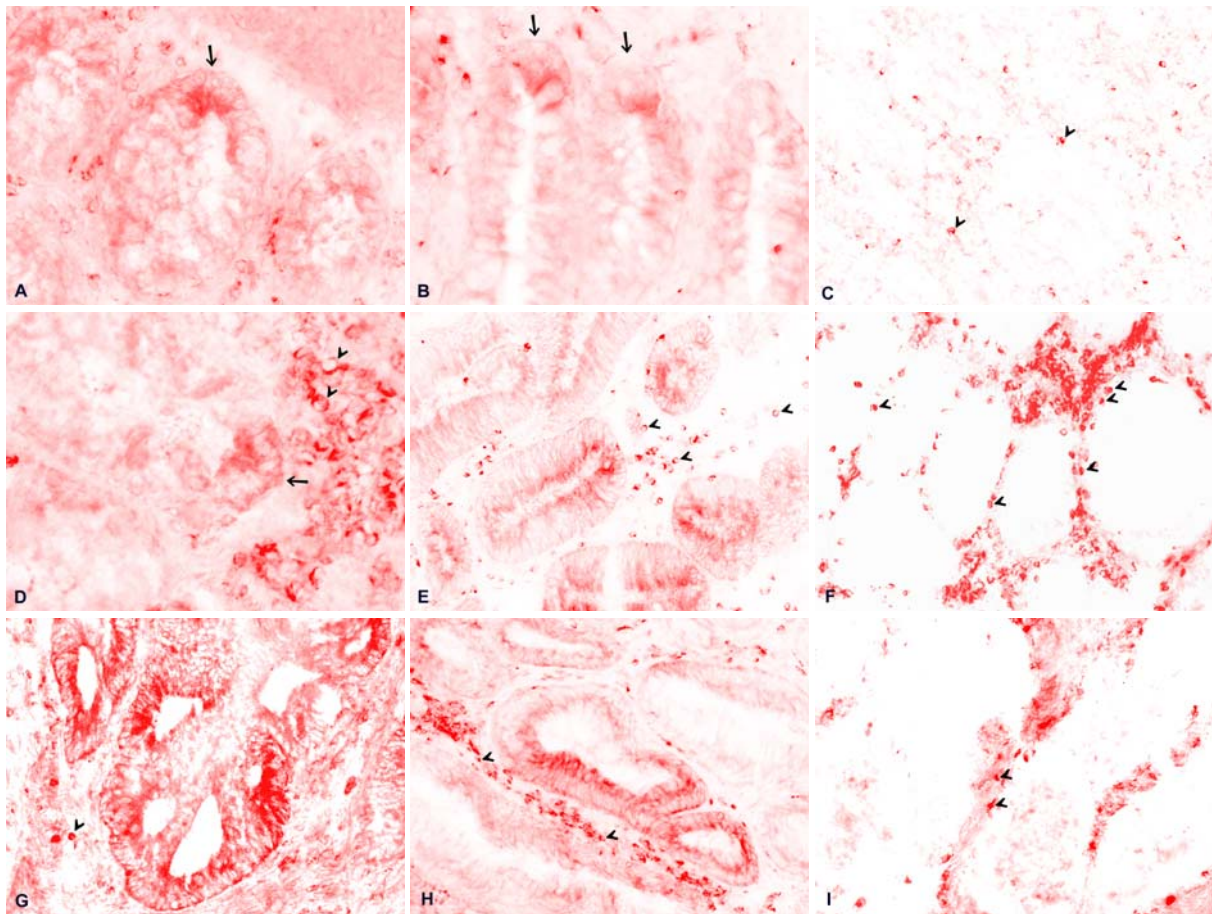


Abb. 5-1: Immunfluoreszenzfärbung von Bcl-2 (rot) im Kolonepithel. Gefrierschnitte. Die Bcl-2-Färbung der Bcl-2-positiven Proben ist cytoplasmatisch. Die Kryptenbasis ist am stärksten Bcl-2-gefärbt (Pfeile). Die Lymphozyten (einige sind exemplarisch durch Pfeilköpfe gekennzeichnet) in der Lamina propria mucosae zeigen immer starke Bcl-2-Färbung und dienen daher als eine interne Kontrolle.

A: Normalgewebe eines Menschen ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung. Die Krypten sind Bcl-2-gefärbt mit starker Färbung der Kryptenbasis. Originalvergrößerung 400 x.

B und C: Gewebe von zwei Patienten mit Colitis Ulcerosa. Originalvergrößerung 400 x und 200 x. Die Kryptenepithelzellen zeigen cytoplasmatische Bcl-2-Färbung (B); beim anderen Patienten ist keine Bcl-2-Färbung vorhanden, nur die Lymphozyten sind Bcl-2-gefärbt (C).

D bis F: Polypgewebe von drei Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung. Originalvergrößerung 400 x (D) und 200 x (E, F). Die Proben sind Bcl-2-positiv bezüglich einer Färbung der Kryptenepithelzellen (D und E) oder sind Bcl-2-negativ (F). Die Lymphozyten sind auch in der negativen Probe stark Bcl-2-gefärbt (F).

G bis I: Tumorgewebe (Adenokarzinom) von drei Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung. Originalvergrößerung 200 x. Die Krypten sind Bcl-2-positiv mit stellenweise starker Bcl-2-Färbung (G). Beim anderen Patienten zeigen manche Krypten stellenweise starke Bcl-2-Färbung, während andere Krypten nur schwach gefärbt sind (H). Die dritte hier gezeigte Probe ist Bcl-2-negativ, nur die Lymphozyten sind stark Bcl-2-gefärbt (I).

Die Bcl-2-Färbung zeigt in allen vier Untersuchungsgruppen Normal, Colitis Ulcerosa, Polyp und Tumor keine wesentlichen Unterschiede: In der Regel ist eine cytoplasmatische Bcl-2-Färbung der Kryptenepithelzellen vorhanden; einige wenige Proben sind Bcl-2-negativ; die Lymphozyten sind jedoch immer stark Bcl-2-gefärbt.

Auch die **Bcl-2-Expression auf RNA-Ebene** (Abb. 4-160) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den fünf Untersuchungsgruppen Normal, CU, MC, Polyp und Tumor.

Beachtenswert ist aber, dass die CU-Gruppe sich aufspaltet in zwei Untergruppen mit niedrigerer bzw. stark erhöhter Bcl-2-RNA-Expression im Vergleich zur Normalgruppe (Abb. 4-160.b). Die gegenüber der Normalgruppe niedrigeren Werte der Bcl-2-RNA-Expression der CU-Proben lassen sich damit erklären, dass in entzündlichem Gewebe ein erhöhter Bedarf an Reparatur der durch die Entzündung entstandenen Schäden besteht und deshalb eine Verminderung der Proliferationsrate sinnvoll ist.

Die Polyp- und Tumorgruppe zeigt eine etwas erhöhte Bcl-2-RNA-Expression gegenüber der Normalgruppe. Die erhöhten Werte der CU-Gruppe liegen auf etwa gleicher Höhe mit den erhöhten Extremwerten der Polyp- und Tumorgruppe. Man kann vermuten, dass die größere Bcl-2-RNA-Menge zu vermehrtem Bcl-2-Protein führt und ein gesteigertes Tumorrisiko bedeutet aufgrund einer daraus folgenden höheren Proliferationsrate und einer vermehrten Blockierung der Apoptose. Diese Annahme muss jedoch mit Vorsicht betrachtet werden und durch weitere Experimente abgesichert werden, denn der Großteil der Bcl-2-RNA-Expressionswerte der Polyp- und Tumorproben befinden sich auf gleicher Höhe mit den Werten der Normalgruppe (Abb. 4-160.b). Trotzdem weisen die Polyp- und Tumorgruppe einige stark erhöhte Extremwerte auf, so dass sich eine im Vergleich zur Normalgruppe insgesamt etwas höhere Bcl-2-RNA-Expression ergibt. Ein Zusammenhang der erhöhten Bcl-2-Werte der CU-, Polyp- und Tumorproben und der Entstehung von Tumoren liegt daher nahe.

Die **Expression von Survivin** im Kolonepithel zeigt auf RNA- und Proteinebene ein übereinstimmendes Ergebnis. Es gibt eine erhöhte Menge an **Survivin-Protein** im Zellkern von Kolon-Polyp- und Kolon-Tumorgewebe im Gegensatz zu Epithelgewebe von CU-Patienten und normalem Kolonepithel (siehe Kapitel 4.1.3. und Abb. 5-2). 90% der untersuchten Polyp- und Tumorproben haben eine Survivin-Zellkernfärbung und die Survivinfärbung ist deutlich intensiver als bei den Normal- und CU-Proben.

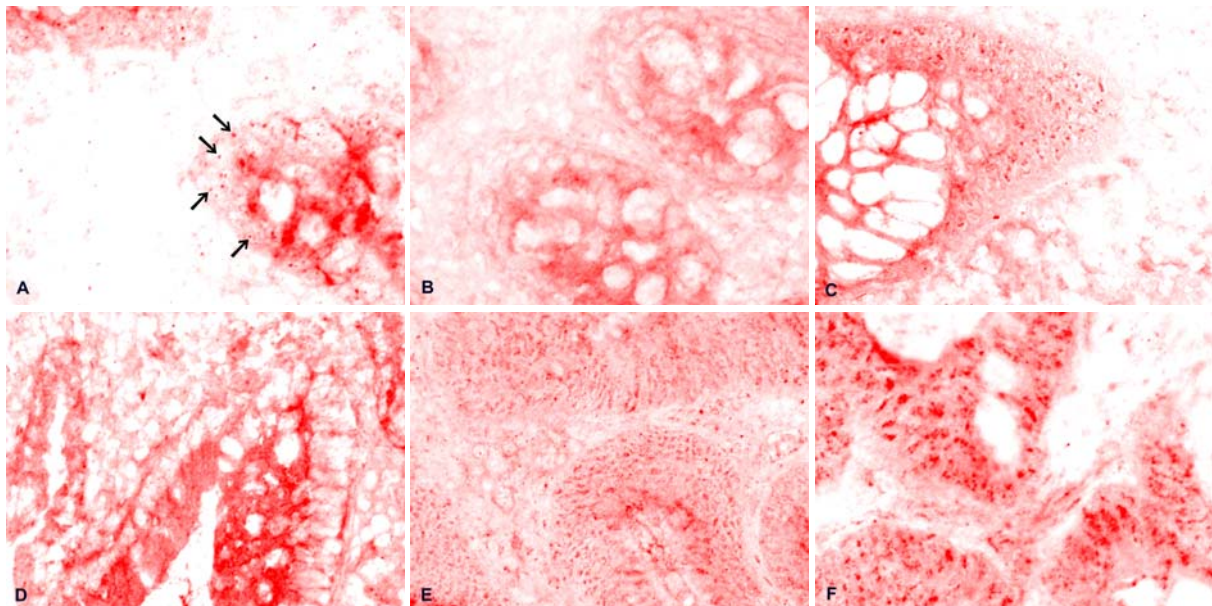


Abb. 5-2: Immunfluoreszenzfärbung von Survivin (rot) im Kolonepithel. Gefrierschnitte. Die Survivinfärbung kann das Cytoplasma und die Zellkerne (siehe Pfeile) betreffen. Originalvergrößerung 400 x.

A und B: Normalgewebe von zwei Menschen ohne CED. Bei einer Probe ist Survivinfärbung im Zellkern vorhanden (A), bei der anderen nicht (B). Beide Proben zeigen cytoplasmatische Survivinfärbung.

C und D: Gewebe von zwei CU-Patienten. Auch hier gibt es in beiden Proben cytoplasmatische Survivinfärbung; eine Probe hat Survivinfärbung im Zellkern (C), die andere Probe nicht (D). Stattdessen zeigt die Probe starke cytoplasmatische Survivinfärbung (D).

E: Polypgewebe eines Menschen ohne CED. Es ist deutliche Survivin-Zellkernfärbung vorhanden.

F: Tumorgewebe (Adenokarzinom) eines Patienten ohne CED. Die Zellkerne der Kryptenepithelzellen zeigen starke Survivinfärbung. Das Cytoplasma ist ebenfalls Survivin-gefärbt.

Auch auf **RNA-Ebene ist die Survivin-Expression** (Abb. 4-161) in der Polyp- und Tumorgruppe signifikant höher im Vergleich zur Normalgruppe (Polyp: $p=0,0006$; Tumor: $p<0,0001$). Man weiß, dass Survivin die Apoptose hemmt und die Proliferation fördert, was eine entscheidende Rolle spielt bei der Entstehung von Tumoren über Adenome als Tumorstufe. Der erhöhte Gehalt an Survivin sowohl auf RNA- wie auch auf Proteinebene in den Kolonpolyp- und -Tumorproben bestätigt die Eigenschaft von Survivin als Tumormarker.

Bei der CU-Gruppe ist der Anteil an Survivinfärbung im Zellkern am kleinsten (75%), stattdessen hat sie den höchsten Anteil an Proben mit starker cytoplasmatischer Survivinfärbung. Auf RNA-Ebene ist Survivin in der CU-Gruppe am niedrigsten exprimiert, wobei der Unterschied zur Normalgruppe aber nicht signifikant ist (Abb. 4-161.b). Die CU-Gruppe besitzt zwei Extremwerte mit gegenüber der Normalgruppe erhöhter Survivin-RNA-Expression. In diesen zwei Proben lässt sich die erhöhte Survivin-RNA-Expression eventuell als Übergang zur Tumorentstehung interpretieren, doch diese zwei Werte sind immer noch um einige Größenordnungen niedriger als die erhöhten Survivin-RNA-Werte der Polyp- und Tumorgruppe. Die einzige untersuchte Polypprobe der CU-Gruppe hat keinen erhöhten Survivin-RNA-Gehalt. Damit wäre eine erhöhte Survivin-RNA-Expression im Kolonepithelgewebe von CU-Patienten als früher Marker für ein Tumorrisiko möglich, aber anhand des vorliegenden Ergebnisses nicht eindeutig.

Die immunhistochemische Darstellung des **p53-Proteins** im Kolonepithel (siehe Kapitel 4.1.4. und Abb. 5-3) liefert ein klares Ergebnis: Eine Anreicherung des p53-Proteins im Zellkern der Kryptenepithelzellen scheint häufiger im Tumorgewebe des Kolonepithels (75% der untersuchten Proben) als im Kolonpolypgewebe (50% der untersuchten Proben) aufzutreten und selten oder niemals im nicht dysplastischen Kolonepithel von CED-Patienten. Von den untersuchten CU-Proben zeigt nur eine Probe p53-Färbung im Zellkern und bei dieser Probe handelt es sich um eine Polypprobe eines CU-Patienten. Im untersuchten normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED gibt es keine p53-Zellkernfärbung.

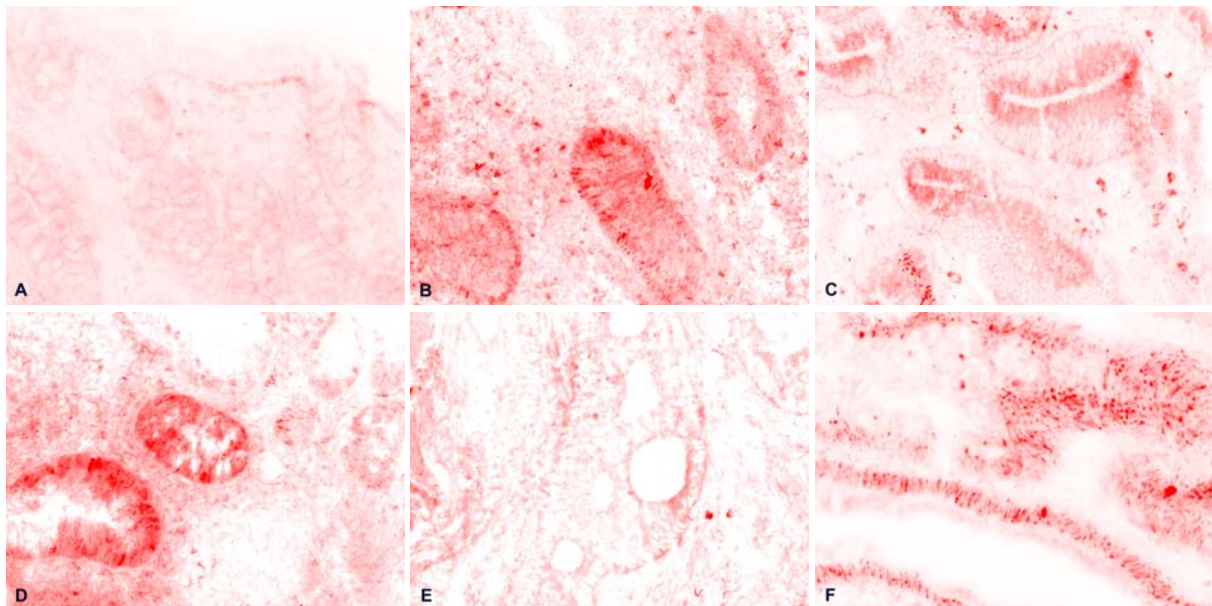


Abb. 5-3: Immunfluoreszenzfärbung von p53 (rot) im Kolonepithel. Gefrierschnitte. Bei den p53-positiven Proben tritt die p53-Färbung ausschließlich in den Zellkernen der Kryptenepithelzellen auf. Originalvergrößerung 200 x.
 A: Normalgewebe eines Menschen ohne CED. Es ist keine p53-Zellkernfärbung vorhanden.
 B: Polypgewebe eines CU-Patienten. Die Zellkerne der Krypten zeigen p53-Färbung.
 C und D: Polypgewebe von zwei Patienten ohne CED. Bei einer Probe ist keine p53-Färbung im Zellkern vorhanden (C), stattdessen scheint es cytoplasmatische p53-Färbung zu geben. Die Probe des anderen Patienten zeigt starke p53-Färbung in den Zellkernen der Kryptenepithelzellen (D).
 E und F: Tumorgewebe (Adenokarzinom) von zwei Patienten ohne CED. Bei der Probe des einen Patienten gibt es keine p53-Färbung im Zellkern (E), bei der Probe des anderen Patienten ist eine deutliche p53-Färbung der Zellkerne der Kryptenepithelzellen zu sehen (F).

Obwohl über frühe p53-Mutationen, die noch vor Entstehen einer Dysplasie auftreten, berichtet worden ist⁷⁹, zeigen die untersuchten Darmepithelproben von CU-Patienten keine Anreicherung von p53-Protein im Zellkern. Nur von den zwei Polypproben der CU-Gruppe ist eine Probe p53-positiv. Dies deutet darauf hin, dass eine p53-Anreicherung im Zellkern frühestens in dysplastischen Veränderungen oder Polypen, jedoch selten in noch nicht dysplastisch verändertem Gewebe von CU-Patienten auftritt.

Auch auf RNA-Ebene besteht in Bezug auf p53 ein deutlicher Unterschied zwischen der Polyp- und Tumorguppe und den anderen Untersuchungsgruppen. Sowohl in der Polyp- ($p=0,0016$) wie auch in der Tumorguppe ($p=0,0001$) ist die **p53-RNA-Expression** (Abb. 4-162) signifikant höher als im normalen Kolonepithel.

In den untersuchten Kolonepithelproben der CU-Patienten ist der p53-RNA-Gehalt etwas niedriger im Vergleich zu den normalen Kolonepithelproben von Menschen ohne CED, der Unterschied ist aber nicht signifikant.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann man schließen, dass p53 auf RNA- und Proteinebene sich nicht als früher Marker für ein CED-bedingtes Tumorrisiko eignet, wenn er dieses schon vor Entstehen einer Dysplasie anzeigen soll.

Obwohl das Ergebnis bezüglich p53 auf RNA- und auf Proteinebene übereinstimmend ist, ist von einem ursächlichen Zusammenhang zwischen erhöhter p53-RNA- und erhöhter p53-Protein-Menge nicht auszugehen. Man weiß, dass die Anreicherung von p53 im Tumorgewebe meistens die Folge von Mutationen im p53-Gen ist, wodurch ein verändertes und funktionsloses p53-Protein entsteht, das stabiler ist als das normale p53-Protein.¹³⁴ Dagegen ist die erhöhte p53-RNA-Expression nicht unbedingt die Folge von Mutationen im p53-Gen, sondern kann auch andere Gründe haben, wie zum Beispiel eine Hochregulierung der Transkription des p53-Gens oder stabilere p53-RNA-Varianten. Die erhöhte p53-RNA-Expression muss auch nicht zwingend zu einem funktionslosen p53-Protein führen.

Anhand der Tatsache, dass die erhöhte p53-RNA-Expression nur in den Polyp- und Tumorguppen auftritt, muss jedoch angenommen werden, dass wie bei der Anreicherung von p53 auf Proteinebene auch bei der erhöhten p53-RNA-Menge ein ursächlicher Zusammenhang mit der Tumorentstehung besteht. Eine denkbare Erklärung wäre die Tatsache, dass durch eine abnorm erhöhte Transkriptionsrate von p53 das Risiko steigt, dass es zu Fehlern beim Ablesen des p53-Gens kommt, was zu fehlerhaften p53-RNAs und möglicherweise funktionslosen oder in der Funktion eingeschränkten p53-Proteinen führt. Der Grund für die erhöhte Transkription könnte eine Störung der Regulation der Transkriptionsrate sein. Die funktionslosen p53-Proteine können ihre Aufgabe, nämlich Regulation des Zellzyklus und Einleitung der Apoptose nicht wahrnehmen, wodurch es zur Tumorentstehung kommt. Es ist bekannt, dass fehlerhafte p53-Proteine Komplexe mit intakten p53-Proteinen eingehen können, wodurch auch diese ihre Funktion verlieren.⁷⁷

Bei dem erhöhten p53-RNA-Gehalt kann es sich aber auch um eine Hochregulierung der p53-Genexpression infolge des Tumors handeln, da in geschädigtem Gewebe oder in Zellen mit unnatürlich hoher Zellteilungsrate vermehrt p53 benötigt wird.

Man fand heraus, dass in Zellen, bei denen man durch UV- oder radioaktive Strahlung Schäden hervorgerufen hat, die Konzentration an p53-Protein erhöht ist durch verlangsamten Abbau des normalerweise sehr kurzlebigen Moleküls.¹³⁵ Es stellt sich die Frage, ob auch verstärkte Transkription des p53-Gens durch DNA-schädigende Behandlung induziert werden kann und ob das daraus hervorgehende p53-Protein intakt ist.

Von Musashi-1 ist bekannt, dass es im Stammzellbereich der Krypten exprimiert wird und vermutlich eine Rolle bei der Zellteilung der Stammzellen spielt.^{22,23} Die **RNA-Expression von Musashi-1** (Abb. 4-163) ist in der Gruppe Tumor am höchsten: Im Vergleich zur Normalgruppe ist der Unterschied nicht signifikant ($p=0,0549$), im Vergleich zwischen Tumor- und CU-Gruppe gibt es einen signifikanten Unterschied ($p=0,0007$).

In der CU-Gruppe ist die Musashi-1-RNA-Expression am niedrigsten, mit einem signifikanten Unterschied zur Normalgruppe ($p=0,0123$).

Die erhöhte RNA-Expression von Musashi-1 im Kolontumor ließe sich sinnvoll durch die Tatsache begründen, dass Tumorzellen die Eigenschaft haben, in einen undifferenzierten Zustand zurückzukehren und eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit wiederzuerlangen, ähnlich wie es bei Stammzellen der Fall ist. Die Gruppe Polyp unterscheidet sich von der Normalgruppe durch zwei erhöhte Extremwerte, die auf derselben Höhe liegen wie die Extremwerte der Tumorgruppe. Auch Polypgewebe hat, wenn auch in begrenzterem Maße als Tumorgewebe, die Eigenschaft übermäßig zu proliferieren.

Die niedrige Musashi-1-RNA-Expression in der CU-Gruppe könnte genauso wie die niedrige Bcl-2-RNA-Expression in der CU-Gruppe erklärt werden: In entzündlichem, reparaturbedürftigem Gewebe ist eine übermäßige Zellteilung nicht sinnvoll. Durch übermäßige Proliferation könnten sich Zellschäden und Mutationen vervielfältigen, was zur Entstehung von Adenomen und Tumoren führen würde.

Die **RNA-Expression von β -Catenin** (Abb. 4-166) ist in der Tumorgruppe sehr hoch und im Vergleich zu allen anderen Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied (Tumor und Normal: $p < 0,0001$; Tumor und Polyp: $p = 0,0005$). Auch die Expression in der Polypgruppe ist im Vergleich zu Normal stark erhöht ($p < 0,0001$). Die β -Catenin-RNA-Expression ist in den Gruppen CU und MC geringfügig erhöht im Vergleich zur Normalgruppe.

Alle untersuchten Tumorproben haben β -Catenin-RNA-Expressionswerte, die oberhalb der Werte der Normalproben liegen. Es ist denkbar, dass die stark erhöhte β -Catenin-RNA-Expression der untersuchten Tumorproben eine Zunahme von freiem, nicht membrangebundenem β -Catenin im Cytoplasma verursacht, welches in den Zellkern wandert und durch Aktivierung bestimmter Zielgene eine gesteigerte Proliferation der Zelle bewirkt.

Das Ergebnis der **IL6-RNA-Expression** (Abb. 4-164) ist übereinstimmend mit den Angaben aus der Literatur: Sie ist in der Tumor- und in der CU-Gruppe im Vergleich zur Normalgruppe stark erhöht (Tumor: $p < 0,0001$; CU: $p = 0,0245$). Die IL6-RNA-Expression ist in der Tumorgruppe um ein Vielfaches höher als in der CU-Gruppe; der Unterschied ist signifikant ($p = 0,0014$). Damit bestätigt sich auf RNA-Ebene, dass Abwehrprozesse des Immunsystems, an denen auch IL6-produzierende Entzündungszellen, wie zum Beispiel Makrophagen beteiligt sind, bei der Tumorbekämpfung eine bedeutende Rolle spielen. Außerdem gibt es Tumorzellen, die selbst IL6 produzieren.¹²⁰

Die Polypprobe der CU-Gruppe mit p53-Anreicherung im Zellkern (siehe Seite 87) zeigt einen sehr hohen IL6-RNA-Gehalt im Vergleich zu den anderen CU-Proben (siehe Extremwert der CU-Gruppe in Abb. 4-164, rechts). Bei den Polypproben von Menschen ohne CED ist die IL6-RNA-Menge dagegen nur geringfügig erhöht im Vergleich zur Normalgruppe (Abb. 4-164, links).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Vorliegen einer CED der IL6-RNA-Gehalt bereits in nicht dysplastisch verändertem Kolonepithel erhöht ist und im Polypgewebe nochmals deutlich ansteigt. In den untersuchten Tumorproben von Menschen ohne CED ist der IL6-RNA-Gehalt am größten. Im normalen Kolonepithel von Menschen ohne CED ist IL6 auf RNA-Ebene kaum nachzuweisen. Da unter den nicht dysplastischen CU-Proben keine einen IL6-RNA-Gehalt aufweist, der sich in der Größenordnung der Polypprobe des CU-Patienten oder der Tumorproben befindet, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht geschlossen werden, dass sich die IL6-RNA-Menge als Marker eignet, um ein CED-bedingtes Tumorrisiko noch vor Entstehen der Dysplasie anzuzeigen.

Auch die **COX-2-RNA-Expression** (Abb. 4-165) ist erwartungsgemäß in der CU- und der Tumorgruppe am höchsten, mit einem signifikanten Unterschied zur Normalgruppe (Tumor: $p = 0,0379$; CU: $p = 0,0375$). Im Gegensatz zur IL6-RNA-Expression besteht bei der COX-2-RNA-Expression nahezu kein Unterschied zwischen CU und Tumor. Das Ergebnis bestätigt COX-2 in seiner Funktion bei der Beteiligung an Entzündungsprozessen und beim Übergang von der Entzündung zum Tumor.

Die Polyprobe der CU-Gruppe hat keinen höheren COX-2-RNA-Gehalt als die anderen CU-Proben.

Als spezifischer, zuverlässiger Marker, der frühzeitig ein CED-bedingtes Tumorrisiko aufdeckt, scheint COX-2 sich auf RNA-Ebene nicht zu eignen.

Aufgrund der relativ kleinen Stichprobe (N=7) lässt sich bezüglich der RNA-Expression der MC-Gruppe keine gesicherte Aussage machen, aber es scheint zwischen der CU- und der MC-Gruppe keinen Unterschied in der RNA-Expression der untersuchten Gene zu geben. Die Werte der Proben der MC-Gruppe liegen immer innerhalb des Bereichs der Werte der CU-Proben. Das entspricht der heutigen Auffassung, dass es zwischen CU und MC keinen grundsätzlichen Unterschied gibt bezüglich der Entstehung CED-bedingter Tumore.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Ereignisse dem erhöhten Tumorrisiko im Kolonepithel von Menschen mit einer CED zugrunde liegen. Um die Gefahr der Tumorentstehung rechtzeitig erkennen zu können, sollten frühe Marker gefunden werden, die die Bereitschaft, einen Tumor zu entwickeln, noch vor Entstehen seiner Vorstufen anzeigen. Dazu wurde mit Hilfe der Methode der Real Time PCR und der Immunfluoreszenzfärbung die RNA- und die Proteinexpression bestimmter Gene untersucht. Das Probenmaterial war normales Kolonepithel von Menschen ohne CED, Kolonepithel von Patienten mit einer CED, Kolonpolyp- und Kolontumorgewebe von Menschen ohne CED.

Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, dass aufgrund der individuellen Unterschiede der Patienten, von denen die Proben stammen, erwartungsgemäß auch Schwankungen in den Ergebnissen innerhalb einer Untersuchungsgruppe zu erwarten sind. Um den sich aus der Inhomogenität des Probenmaterials ergebenden Unterschieden besser gerecht zu werden, wären weiterführende Experimente sinnvoll, bei denen speziell die CU-Gruppe mit einer größeren Anzahl an Proben untersucht wird, und bei denen die Unterschiede der Proben berücksichtigt werden durch nochmalige Unterteilung der CU-Gruppe in verschiedene Untergruppen.

Auch wäre eine Einbeziehung weiterer Gruppen in die Untersuchung sinnvoll, wie zum Beispiel Dysplasieproben von CU-Patienten als ein wichtiges Stadium beim Übergang zum CED-bedingten Tumor und außerdem Tumorgewebe von CED-Patienten im Vergleich zu Tumorgewebe von Patienten ohne CED.

Trotz der von Natur aus gegebenen Variabilität der Proben liefert die Untersuchung der RNA- und Proteinexpression von Bcl-2, Survivin und p53, und der RNA-Expression von Musashi-1, COX-2, IL6 und β -Catenin eindeutige Ergebnisse.

Die Ergebnisse der RNA-Expression von COX-2 und IL6 bestätigen deren wichtige Funktion bei Entzündungen und der Entstehung von Tumoren auch im Kolonepithel: Die COX-2- und IL6-RNA-Expression ist in der CU- und in der Tumorgruppe im Vergleich zur Normalgruppe signifikant erhöht.

Der IL6-RNA-Gehalt ist in der Tumorgruppe nochmals um ein Vielfaches höher als in der CU-Gruppe. Auch die Polypprobe eines CU-Patienten hat deutlich mehr IL6-mRNA als die anderen CU-Proben. Daraus lässt sich schließen, dass IL6 auf RNA-Ebene sich als Marker für Entzündungsvorgänge und für CED-bedingte Tumore eignen könnte. Ob sich der IL6-RNA-Gehalt jedoch als früher Marker für die Entstehung CED-bedingter Tumore eignet, wenn er das Tumorrisiko bereits vor Auftreten einer Dysplasie oder eines Polypen anzeigen soll, lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beantworten. Mehr Klarheit würde die Untersuchung von Dysplasieproben von CED-Patienten bringen.

Die COX-2-RNA-Expression ist in der CU- und in der Tumorgruppe nahezu gleich. Da der COX-2-RNA-Gehalt bei Entzündungsvorgängen anscheinend genauso stark erhöht ist wie im Tumor, kann er nicht als Marker für ein CED-bedingtes Tumorrisiko funktionieren.

Die β -Catenin-RNA-Expression ist in den Polyp- und in den Tumorproben signifikant erhöht gegenüber den Normalproben, was zeigt, dass β -Catenin bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielt. Der Anstieg der β -Catenin-RNA-Menge könnte einen Anstieg von freiem β -Catenin in der Zelle bewirken, welches in den Zellkern wandert und bestimmte Zielgene aktiviert, die für eine verstärkte Proliferation der Zelle sorgen. In den CU-Proben ist der β -Catenin-RNA-Gehalt kaum erhöht gegenüber den Normalproben.

Musashi-1 ist auf RNA-Ebene in den untersuchten Kolontumorproben am stärksten exprimiert, was sich damit begründen lässt, dass Musashi-1 in den Stammzellen der Krypten vorkommt und Tumorzellen die Eigenschaft haben, in einen undifferenzierten, unbegrenzt teilungsfähigen Zustand zurückzukehren und sich somit ähnlich wie Stammzellen zu verhalten. In der CU-Gruppe ist die Musashi-1-RNA-Menge am niedrigsten mit einem signifikanten Unterschied gegenüber der Normalgruppe. Das ist damit erklärbar, dass in entzündlichem Gewebe die Reparatur von Schäden besonders wichtig ist, so dass eine verminderte Zellteilungsrate sinnvoll ist.

Bcl-2 zeigt auf Proteinebene keine auffälligen Unterschiede in den vier Untersuchungsgruppen. Die erhöhten Bcl-2-RNA-Expressionswerte der CU-Gruppe könnten ein Tumorrisiko anzeigen. Diese Annahme muss jedoch durch weitere Experimente abgesichert werden, zum Beispiel durch die Untersuchung von Dysplasieproben, da sie den Übergang von der Entzündung zum Tumor darstellen. Die untersuchte Polypprobe eines CU-Patienten zeigt keine erhöhte Bcl-2-RNA-Expression.

Die signifikant erhöhte p53-Menge auf RNA- und auf Proteinebene betrifft nur die Polyp- und Tumorproben, nicht aber die CED-Proben. Nur eine der beiden Polypproben der CU-Gruppe zeigt eine Anreicherung des p53-Proteins im Zellkern. Alle anderen CED-Proben sind negativ bezüglich einer p53-Anreicherung im Zellkern. Das deutet darauf hin, dass eine erhöhte p53-Expression frühestens in Dysplasien und im Polypgewebe auftritt. Deshalb scheint p53 sich auf RNA- und Proteinebene nicht als früher Tumormarker zu eignen, wenn er ein CED-bedingtes Tumorrisiko noch vor Entstehen der Dysplasie anzeigen soll.

Survivin bestätigt sich auch im Kolonepithel als Tumormarker sowohl auf RNA- wie auch auf Proteinebene. Ob die erhöhte Survivin-RNA-Expression in einigen Proben der CU-Gruppe im Sinne eines damit verbundenen Tumorrisikos interpretiert werden kann, lässt sich nicht mit Sicherheit beantworten. Dagegen spricht, dass die Polypprobe der CU-Gruppe keinen erhöhten Survivin-RNA-Gehalt aufweist. Weitere Experimente wären nötig um zu klären, ob Survivin sich als früher Marker für die Entstehung CED-bedingter Tumore eignet.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
Abb.	Abbildung
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARD	caspase recruitment domain
cDNA	complementary DNA
Cdx1	Caudal type homeo box transcription factor 1
Cdx2	Caudal type homeo box transcription factor 2
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
cm	Zentimeter
COX-2	Cyclooxygenase-2
c _T	threshold cycle
CU	Colitis Ulcerosa
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCC	deleted in colorectal cancer
DFF	DNA-Fragmentierungsfaktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nucleosid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreit
empf.	empfohlen
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
Fz	frizzled
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3β
h	Stunde
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IL6	Interleukin 6
IL10	Interleukin 10
Konz.	Konzentration
k-ras	kirsten-rat sarcoma virus
l	Liter
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LRH-1	liver receptor homolog-1
M	Molar
MC	Morbus Crohn
min	Minuten
ml	Milliliter
MLH1	mutL homolog 1
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
NF-kappaB	Nuclear Factor of kappaB

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
NOS2	Stickstoffoxidsynthase-2
NSAIDs	nonsteroidal antiinflammatory drugs (nichtsterioide entzündungshemmende Medikamente)
PARP	poly(ADP-ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pmol	Pikomol
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
Schmelztemp.	Schmelztemperatur
sec	Sekunden
TCF	T-Cell Factor
TGF- β	Tumor Growth Factor- β
TNF-alpha	Tumor Necrosis Factor-alpha
u	unit
Wnt	wingless-type

Danksagung

Zuerst möchte ich mich für die Betreuung, die hilfreichen, ausführlichen Gespräche und für das Interesse am Fortgang der Doktorarbeit bei Herrn Professor Dr. R. Hardeland bedanken. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. G. Ramadori für die Betreuung und Anleitung dieser extern durchgeführten Arbeit, für das Interesse am Fortgang der Dissertation und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Universitätsklinik Göttingen.

Für die anregenden fachlichen Diskussionen und die Hilfe bei praktischen Problemen danke ich Frau Dr. S. Cameron und Herrn Dr. J. Dudas.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich außerdem Herrn Professor Dr. E. Wimmer danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit moralisch unterstützt hat.

Literaturverzeichnis

1. Schölmerich J, Schmiegel W (2005) Leitfaden kolorektales Karzinom - Prophylaxe, Diagnostik, Therapie. UNI-MED Science Verlag, 2. Auflage
2. Lindblom A (2001) Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Current Opinion in Oncology* 13: 63-69
3. Calabrese P, Tavare S, Shibata D (2004) Pretumor progression. Clonal evolution of human stem cell populations. *American Journal of Pathology* 164 (4): 1337-1346
4. Sancho E, Batlle E, Clevers H (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annual Reviews Cell Dev. Biol.* 20: 695-723
5. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR (2002) Mutations in APC, Kirsten-ras and p53 – alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (14): 9433-9438
6. Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170
7. Arnold CN, Blum HE (2002) Mikrosatelliteninstabilität und das kolorektale Karzinom: die Rolle der hMLH1 Promotormethylierung. *Z Gastroenterol.* 40: 769-771
8. Gryfe R, Gallinger S (2001) Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and colorectal cancer. *Surgery* 130: 17-20
9. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research* 61: 3225-3229
10. Herman JG (2002) Hypermethylation pathways to colorectal cancer. Implications for prevention and detection. *Gastroenterology Clinics of North America* 31: 945-958
11. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal development. *N Engl J Med.* 319 (9): 525-532
12. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767
13. Cairns J (1975) Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 255: 197-200
14. Shih I-M, Wang T-L, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *PNAS* 98 (5): 2640-2645
15. Radtke F, Clevers H (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307: 1904-1909
16. Reya T, Clevers H (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434: 843-850
17. Wright NA, Alison M (1984) *The Biology of Epithelial Cell Populations.* Oxford University Press

18. Potten CS, Allen TD (1977) Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *J Ultrastruct Res* 60: 272-277
19. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC (2003) Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet*. 362 (9379): 205-209
20. Reed JC (2001) The survivin saga goes in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (7): 965-969
21. Ilyas M, Hao X-P, Wilkinson K, Tomlinson IP, Abbasi AM, Forbes A, Bodmer WF, Talbot IC (1998) Loss of Bcl-2 expression correlates with tumour recurrence in colorectal cancer. *Gut* 43: 383-387
22. Nishimura S, Wakabayashi N, Toyoda K, Kashima K, Mitsufuji S (2003) Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells. *Digestive Diseases and Sciences* 48(8): 1523
23. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H (2003) Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 71: 28-41
24. Wong NACS, Pignatelli M (2002) β -Catenin – a linchpin in colorectal carcinogenesis? *American Journal of Pathology* 160 (2): 389-401
25. Katz JP, Kaestner KH (2002) Cellular and molecular mechanisms of carcinogenesis. *Gastroenterology Clinics of North America* 31: 379-394
26. Iyer NG, Chin S-F, Ozdag H, Daigo Y, Hu D-E, Cariati M, Brindle K, Aparicio S, Caldas C (2004) p300 regulates p53-dependent apoptosis after DNA damage in colorectal cancer cells by modulation of PUMA/p21 levels. *PNAS* 101 (19): 7386-7391
27. Wong NACS, Mayer NJ, Anderson CE, McKenzie HC, Morris RG, Diebold J, Mayr D, Brock IW, Rayds JA, Gilmour HM, Harrison DJ (2003) Cyclin D1 and p21^{WAF1/CIP1} in ulcerative colitis-related inflammation and epithelial neoplasia: a study of aberrant expression and underlying mechanisms. *Hum Pathol.* 34: 580-588
28. Cory S, Huang DCS, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607
29. Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16
30. Ruemmele FM, Dionne S, Qureshi I, Sarma DSR, Levy E, Seidman EG (1999) Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death and Differentiation* 6: 729-735
31. Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Schölmerich J (2001) Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis (“Anoikis”) of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth & Differentiation* 12: 147-155
32. Hyoh Y, Ishizaka S, Horii T, Fujiwara A, Tegoshi T, Yamada M, Arizono N (2002) Activation of caspases in intestinal villus epithelial cells of normal and nematode infected rats. *Gut* 50: 71-77

33. van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Jansen PLM, Moshage H (2004) Chronic inflammation, apoptosis and (pre-)malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Apoptosis* 9 (2):123-130
34. Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B (2002) Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *American Society for Nutritional Sciences*: 1812-1818
35. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Development* 13: 1899-1911
36. Lickert H, Domon C, Huls G, Wehrle C, Duluc I, Clevers H, Meyer BI, Freund J-N, Kemler R (2000) Wnt/ β -catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. *Development* 127: 3805-3813
37. Gregorieff A, Clevers H (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endo-derm to cancer. *Genes & Development* 19: 877-890
38. Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422-426
39. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/Lef1 pathway. *Proc Natl Acad Sci. USA* 96: 5522-5527
40. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512
41. Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chang CG, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Loehrs U, Waldman FM (2002) The APC/ β -Catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas. *Cancer* 94 (5): 1421-1427
42. Soubeyran P, Andre F, Lissitzky JC, Mallo GV, Moucadel V, Roccabianca M, Recherche H, Marvaldi J, Dikic I, Dagorn JC, Iovanna JL (1999) Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* 117: 1326-1338
43. Domon-Dell C, Schneider A, Moucadel V, Guerin E, Guenot D, Aguillon S, Duluc I, Martin E, Iovanna J, Launay JF, Duclos B, Chenard MP, Meyer C, Oudet P, Kedinger M, Gaub MP, Freund JN (2003) Cdx1 homeobox gene during human colon cancer progression. *Oncogene* 22 (39): 7913-7921
44. Silberg DG, Furth EE, Taylor JK, Schuck T, Chiou T, Traber PG (1997) CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology* 113: 478-486
45. Mallo GV, Recherche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan BR, Dusetti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL (1997) Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 74 (1): 35-44
46. Bai YQ, Miyake S, Iwai T, Yuasa Y (2003) CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene* 22 (39): 7942-7949

47. Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, Korcheva V, Mirlacher M, Loda M, Sauter G, Corless CL (2004) The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 17 (11): 1392-1399
48. Clevers H (2004) At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 118 (6): 671-674
49. Hinton JM (1966) Risk of malignant change in ulcerative colitis. *Gut* 7: 427-432
50. MacDougall IP (1964) The cancer risk in ulcerative colitis. *Lancet* 2: 655
51. Sugita A, Sachar DB, Bodian C, Ribiero MB, Aufses AH Jr, Greenstein AJ (1991) Colorectal cancer in ulcerative colitis. Influence of anatomical extent and age at onset on colitis-cancer interval. *Gut* 32: 167-169
52. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420 (6917): 860-867
53. Shacter E, Weitzman SA (2002) Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 16 (2): 217-226, 229; discussion 230-232
54. Baldassarre G, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Chimienti E, Belletti B (2004) Linking inflammation to cell cycle progression. *Curr Pharm Des.* 10 (14) : 1653-1666
55. Choi PM, Zelig MP (1994) Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. *Gut* 35 (7): 950-954
56. Malcomson R, McGregor AH (2002) Molecular screening for colon cancer in inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 14: 1045-1047
57. Loren DE, Lewis J, Kochman ML (2002) Colon cancer: detection and prevention. *Gastroenterology Clinics of North America* 31: 565-586
58. Endlicher E, Herfarth H, Messmann H, Schölmerich J (2002) Strategische Konzepte bei Diagnostik und Therapie von Dysplasien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Chirurgische Gastroenterologie* 18 (2): 148-154
59. Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, Koehler HH, Stolte M, Kanzler S, Nafe B, Jung M, Galle PR, Neurath MF (2003) Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124 (4): 880-888
60. Mudter J, Neurath MF (2003) Mucosal T cells: mediators or guardians of inflammatory bowel disease? *Curr Opin Gastroenterol.* 19 (4): 343-349
61. Schreiber S (2006) Immunregulation chronisch entzündlicher Darmerkrankungen – Heute und morgen. *Falk Symposium* 153. Berlin, 6.-7. Mai 2006.
62. Coste A, Dubuquoy L, Barnouin R, Annicotte J-S, Magnier B, Notti M, Corazza N, Antal MC, Metzger D, Desreumaux P, Brunner T, Auwerx J, Schoonjans K (2007) LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *PNAS* 104 (32): 13098-13103
63. Mueller M, Cima I, Noti M, Fuhrer A, Jakob S, Dubuquoy L, Schoonjans K, Brunner T (2006) The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine. *JEM* 203 (9): 2057-2062

64. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, et al. (2002) Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn's disease: A cohort study. *Lancet* 359: 1661-1665
65. Potter JD (1999) Colorectal cancer: molecules and populations. *Journal of the National Cancer Institute* 91 (11): 916-932
66. Uthoff SM, Eichenberger MR, Lewis RK, Fox MP, Hamilton CJ, McAuliffe TL, Grimes HL, Galandiuk S (2001) Identification of candidate genes in ulcerative colitis and Crohn's disease using cDNA array technology. *Int J Oncol.* 19 (4): 803-810
67. Aust DE, Baretton GB, Waldman FM, Lohrs U (1999) Molecular carcinogenesis in ulcerative colitis-associated and sporadic colorectal carcinoma – differences and similarities. *Verh Dtsch. Ges Pathol.* 83: 130-138
68. Murthy S, Flanigan A, Clearfield H (2002) Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: molecular and clinical features. *Gastroenterology Clinics of North America* 31: 551-564
69. Noffsinger AE, Miller MA, Cusi MV, et al. (1996) The pattern of cell proliferation in neoplastic and nonneoplastic lesions of ulcerative colitis. *Cancer* 78: 2307-2312
70. Cohen SM, Purtilo DT, Ellwein LB (1991) Ideas in pathology. Pivotal role of increased cell proliferation in human carcinogenesis. *Mod Pathol* 4 (3): 371-382
71. Kern SE, Redston M, Seymour AB, Caldas C, Powell SM, Kornacki S, Kinzler KW (1994) Molecular genetic profiles of colitis-associated neoplasms. *Gastroenterology* 107 (2): 420-428
72. Burmer GC, Levine DS, Kulander BG, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS (1990) c-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology* 99: 416-420
73. Tarmin L, Yin J, Harpaz N, Kozam M, Noordzij J, Antonio LB, Jiang HY, Chan O, Cymes K, Meltzer SJ (1995) Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms. *Cancer Res.* 55: 2035-2038
74. Benhattar J, Saraga E (1995) Molecular genetics of dysplasia in ulcerative colitis. *Eur J Cancer* 31A : 1171-1173
75. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B (1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 50: 7717-7722
76. Yin J, Harpaz N, Tong Y, Huang Y, Laurin J, Greenwald BD, Hontanosas M, Newkirk C, Meltzer SJ (1993) p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* 104 (6): 1633-1639
77. Holzmann K, Klump B, Borchard F, Hsieh C-J, Kühn A, Gaco V, Gregor M, Porschen R (1998) Comparative analysis of histology, DNA content, p53 and Ki-ras mutations in colectomy specimens with long-standing ulcerative colitis. *Int J Cancer* 76: 1-6
78. Lashner BA, Shapiro BD, Husain A, Goldblum JR (1999) Evaluation of the usefulness of testing for p53 mutations in colorectal cancer surveillance for ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 94: 456-462

79. Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Rubin CE, Stevens AC, Burner GC (1994) Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 107 (2): 369-378
80. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham A-J, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC (2000) Increased p53 mutation load in non-cancerous colon tissue from ulcerative colitis: A cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Research* 60: 3333-3337
81. Singer I, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111: 871-885
82. Ambs S, Merriam WG, Ogunfusika MO, Bennett WP, Ishibe N, Hussain SP, Tzeng EE, Geller DA, Billiar TR, Harris CC (1998) p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumour growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nat Med* 4: 1371-1376
83. Rubin CE, Haggitt RC, Brumer GC, Brentnall TA, Stevens AC, Levine DS, Dean PJ, Kimmey M, Perera DR, Rabinovitch PS (1992) DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 103: 1611-1620
84. Befrits R, Hammarberg C, Rubio C, Jaramillo E, Tribukait B (1994) DNA aneuploidy and histologic dysplasia in long-standing ulcerative colitis: a 10-year follow-up study. *Dis Colon Rectum* 37: 313-320
85. Ilyas M, Tomlinson IP, Hanby AM, Yao T, Bodmer WF, Talbot IC (1996) Bcl-2 expression in colorectal tumors : evidence of different pathways in sporadic and ulcerative-colitis-associated carcinomas. *Am J Pathol* 149 (5): 1719-1726
86. Mikami T, Yoshida T, Akino F, Motoori T, Yajima M, Okayasu I (2003) Apoptosis regulation differs between ulcerative colitis-associated and sporadic colonic tumors. Association with survivin and bcl-2. *Am J Clin Pathol* 119: 723-730
87. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7: 211-217
88. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357 (9255): 539-545
89. Kuper H, Adami H-O, Trichopoulos D (2000) Infections as a major preventable cause of human cancer. *Journal of Internal Medicine* 248: 171-183
90. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC (2003) Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 276-285
91. Ohshima H, Bartsch H (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 305 (2): 253-264
92. Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ (2001) Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: Linking inflammation to oncogenesis. *Am J Physiol* 281: G626-G634
93. Dang CT, Shapiro CL, Hudis CA (2002) Potential role of selective COX-2 inhibitors in cancer management. *Oncology (Williston Park)* 16 (5 Suppl4): 30-36

94. Williams CS, Mann M, DuBois RN (1999) The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18 (55): 7908-7916
95. Maihöfner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ (2003) Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 24 (4): 665-671
96. Sinicrope FA, Gills S (2004) Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 23: 63-75
97. Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT, Sinicrope FA (2002) Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c – dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Research* 62: 6323-6328
98. Chen X-L, Su B-S, Sun R-Q, Zhang J, Wang Y-L (2005) Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 11 (8): 1228-1231
99. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58 (2): 362-366
100. Kawai N, Tsujii M, Tsuji S (2002) Cyclooxygenases and colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 187-196
101. Rodriguez-Moranta F, Castells A (2005) Mechanisms of colon cancer prevention with and beyond COX-2 inhibition. *Curr Top Med Chem.* 5 (5): 505-516
102. Xu XC (2002) COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs.* 13 (2): 127-137
103. Koehne CH, Dubois RN (2004) COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol.* 31 (2 Suppl 7): 12-21
104. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ (1993) Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Eng J Med.* 328: 1313-1316
105. Steinbach G, Lynch P, Phillips R, Wallace M, Hawk E, Gordon G, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su L, Levin B (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Eng J Med.* 342: 1946-1952
106. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN (1997) Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest.* 99: 2254-2259
107. Rodriguez G, Huerta-Alvarez C (2001) Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Epidemiology* 12: 88-93
108. Wang L, Walia B, Evans J, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV (2003) IL6 induces NF-kappaB activation in the intestinal epithelia. *The Journal of Immunology* 171: 3194-3201

109. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Uriell-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y (2004) NF-kappaB functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431: 4461-4466
110. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer* 2: 301-310
111. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V (1998) Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115 (2): 357-369
112. Raddatz D, Bockemühl M, Ramadori G (2005) Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: 547-557
113. Piancatelli D, Romano P, Sebastiani P, Adorno D, Casciani CU (1999) Local expression of cytokines in human colorectal carcinoma: evidence of specific interleukin-6 gene expression. *J Immunother.* 22 (1): 25-32
114. Braegger CP, MacDonald TT (1994) Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann Allergy* 72 (2): 135-141
115. Herbeval J-P, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C (2004) Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *The Journal of Immunology* 172: 4630-4636
116. Chen GG, Lee JFY, Chan UPF, Xu H, Ip PC, Lau WY (2002) Increased apoptosis in infiltrating mononuclear cells of colorectal cancer. A mechanism for tumor escape. *Arch Pathol Lab Med* 126: 686-691
117. Schneider MR, Hoeflich A, Fischer JR, Wolf E, Sordat B, Lahm H (2000) Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 151 (1): 31-38
118. Caruso C, Lio D, Cavallone L, Franceschi C (2004) Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Annals New York Academy of Sciences* 1028: 1-13
119. Gastl G, Plante M, Finstad CL, Wong GY, Federici MG, Bander NH, Rubin SC (1993) High IL-6 levels in ascitic fluid correlate with reactive thrombocytosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Br J Haematol.* 83: 433
120. Wojtowicz-Praga S (1997) Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J Immunother.* 20 (3): 165-177
121. Seidelin JB, Nielsen OH (2005) Continuous cytokine exposure of colonic epithelial cells induces DNA damage. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17 (3): 363-369
122. Fiocchi C (1997) The immune system in inflammatory bowel disease. *Acta Gastroenterol Belg.* 60 (2): 156-162
123. MacDermott RP (1996) Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 31 (6): 907-916
124. MacDonald TT, Monteleone G (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307: 1920-1925

125. Wong NACS, Harrison DJ (2001) Colorectal neoplasia in ulcerative colitis – recent advances. *Histopathology* 39: 221-234
126. Itzkowitz SH, Yio X (2004) Inflammation and cancer. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G7-G17
127. Habermann JK, Upender MB, Roblick UJ, Krüger S, Freitag S, Blegen H, Bruch H-P, Schimmelpenning H, Auer G, Ried T (2003) Pronounced chromosomal instability and multiple gene amplifications characterize ulcerative colitis-associated colorectal carcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 147: 9-17
128. Riddell RH (1984) Dysplasia and cancer in ulcerative colitis: a soluble problem? *Scand J Gastroenterol Suppl* 104: 137-149
129. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC, et al. (1983) Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 14 (11): 931-968
130. Noffsinger AE, Belli JM, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM (2001) A unique basal pattern of p53 expression in ulcerative colitis is associated with mutation in the p53 gene. *Histopathology* 39: 482-492
131. Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6: 995-1001
132. Haller F, Kulle B, Schwager S, Gunawan B, von Heydebreck A, Sülthmann H, Füzesi L (2004) Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. *Analytical Biochemistry* 335: 1-9
133. Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193
134. Carr NJ, Path FRC, Emory TS, Sobin LH (2002) Epithelial neoplasms of the appendix and colorectum. An analysis of cell proliferation, apoptosis and expression of p53, CD44, and bcl-2. *Arch Pathol Lab Med* 126: 837-841
135. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag, 4. Auflage

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Karin Eilers
Geburtsdatum	01.08.1968
Geburtsort	Varazdin, Kroatien
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1975 – 1978	Grundschule in Göttingen
1978 – 1985	Grundschule und Gymnasium in Neu-Ulm und Ulm
1985 – 1988	Gymnasium in Augsburg
1988	Abitur am Rudolf-Diesel-Gymnasium in Augsburg

Hochschulstudium

1988	Aufnahme des Studiums der Biologie/Diplom in Marburg
1989	Fortführung des Studiums der Biologie/Diplom in München
1989	Fortführung des Studiums der Biologie/Diplom in Freiburg/Brsg.
1991	Vordiplom in Biologie
1992 – 1993	Studium der Politikwissenschaft (Technikfolgenabschätzung, Umweltpolitik) als Nebenfach in Freiburg
1997	Diplom in Biologie mit Molekularbiologie und Genetik als Hauptfach und Wissenschaftliche Politik als nichtbiologisches Nebenfach an der Universität Freiburg
2003 – 2007	Promotion in Biologie an der Universität Göttingen

Beruflicher Werdegang

Mai 2001	Vierwöchige journalistische Tätigkeit beim Göttinger Tageblatt in der Redaktion Magazin (Kultur und Wissenschaft)
November 2001	Vierwöchiges Praktikum beim NDR, Studio Göttingen
April 2002	Freie Mitarbeit bei der Hessischen/Niedersächsischen Allgemeinen (HNA), Redaktion Göttingen

Göttingen, September 2007

Karin Eilers