

Technische Universität München

Institut für Molekulare Immunologie - Labor für Molekulare
Gastroenterologische Onkologie

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. P. A. Knolle)

Untersuchung des Einflusses einer intestinalen, transgenen Überexpression des C-Typ Lektins Reg3 β *in vivo* im Colitis- bzw. Colitis-assoziierten-Colonkarzinom-Mausmodell

Michael Karl Willert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. R. Greten

2. Univ.-Prof. Dr. H. Friess

Die Dissertation wurde am 23.09.2014 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.09.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	Die Gruppe der Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen	8
1.2	Die Ätiopathogenese der Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen und bisherige therapeutische Ansätze.....	10
1.3	Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen und das Colitis-assoziierte Colonkarzinom - Eine Verbindung zwischen Entzündung und Tumorigenese	15
1.4	Synopsis über das Regenerating-iselt- derived-Protein 3 beta (Reg3β)	20
1.5	Das transgene Mausmodell.....	23
1.6	Mausmodelle für die chemische Induktion einer Colitis bzw. eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms	25
2	ZIELSETZUNG	29
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Mausmodelle	30
3.1.1	Transgenes Mausmodell.....	30
3.1.2	Chemische Induktion einer akuten Colitis.....	30
3.1.3	Chemische Induktion eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms.....	30
3.2	Genotypisierung	31
3.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	31
3.2.2	Oligonucleotidsequenzen.....	32
3.2.3	Histologie	33
3.2.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	34
3.2.5	Alcianblau Färbung	34

3.3 Immunhistochemie (IHC).....	35
3.3.1 Prinzip des indirekten Verfahrens	35
3.3.2 Protokoll	35
3.3.4 Verwendete Antikörper (IHC).....	36
3.3.5 Histologische Kriterien für die Grundcharakterisierung.....	37
3.3.7 Histologische Scores zur Auswertung des Gewebes Schadens	38
3.3.7.1 Epitheliale Schaden	38
3.3.7.2 Infiltration von Immun- und Entzündungszellen	38
3.3.7.3 Berechnung des Gesamtscores	38
3.3.8 Histologische Auswertung der Tumorentwicklung	39
3.3.8.1 Ermittlung der Tumorzahl und -größe	39
3.3.8.2 Beurteilung des Proliferations- bzw. Apoptoseverhaltens in Colon-Karzinomen.....	39
3.4 Protein und DNA Analyse	40
3.4.1 Isolierung von Gesamtgewebe	40
3.4.2 Isolierung von intestinalen Epithelzellen	40
3.5 RNA-Isolierung und Analyse	41
3.5.1 RNA-Extraktion aus Geweben bzw. Zellen	41
3.5.2 Realtime Reverse Transcriptase PCR (RT)-PCR	42
3.5.3 cDNA-Synthese	42
3.5.4 RT-PCR.....	43
3.5.5 Delta-C _t -Methode	43
3.5.6 Oligonukleotidsequenzen.....	43
3.6 Agarose Gelelektrophorese der RNA	44
3.7 Proteinbiochemie	45
3.7.1 Proteinextraktion aus Epithelzellen und Gesamtmucosa.....	45
3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	45
3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	46
3.7.5 Immunoblotanalyse	49

3.7.6	Verwendete Antikörper (Immunoblot)	49
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Bestätigung der transgenen Überexpression von Reg3β in Jejunum und Colon im Immunoblot.....	51
4.2	Die Überexpression von Reg3β zeigt keinen Einfluss auf die intestinale Stammzellendifferenzierung und histologische Morphologie in Colon und Jejunum.	52
4.3	Im transgenen Mausmodell zeigt sich gegenüber Wildtypen keine attenuierte Inflammation auf Ebene der Histologie und Expression proinflammatorischer Zytokine in einer DSS-induzierten Colitis	60
4.4	Bei der Induktion eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms wirkte die transgene Überexpression von Reg3β weder pro- noch antitumorigen	64
5	DISKUSSION	68
6	ZUSAMMENFASSUNG	80
7	LITERATURVERZEICHNIS	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Unterschiede in der Entwicklung eines CAC und SCC nach Ullman et al.	18
Abb. 2 Signalkaskade von Reg3 β (PAP), abgewandelt nach Closo et al.	21
Abb. 3 Schematische Gegenüberstellung der Mikroinjektion während des pronukleären bzw. Blastozystenstadiums	24
Abb. 4 Nachweis der transgenen Reg3 β -Überexpression in Dünn- und Dickdarm ..	52
Abb. 5 Histologische Darstellung von repräsentativen Abschnitten in Jejunum und Colon	53
Abb. 6 Messdaten der histologischen Grundcharakterisierung	54
Abb. 7 Analyse verschiedener Zelllinienmarker zur Beurteilung der Stammzellendifferenzierung in Colon und Jejunum	55
Abb. 8 Darstellung und Auswertung BrdU-positiver Zellen in Jejunum und Colon ...	56
Abb. 9 Schematische Übersicht über eine Auswahl an Zellzyklus interagierenden Proteinen	57
Abb. 10 Analyse der mRNA-Level Zellzyklus interagierender Proteine	59
Abb. 11 Zusammenschau der Ergebnisse bei Induktion einer Colitis mit 2,5 % DSS	62
Abb. 12 Expression verschiedener Zytokine unter Induktion einer akut ulzerierenden Colitis mit DSS.....	64
Abb. 13 Zusammenschau der Ergebnisse bei der Induktion eines CAC	66
Abb. 14 Untersuchung von Proliferation und Apoptose in neoplastischen Arealen im CAC-Modell	67

Abkürzungsverzeichnis

ACF	Aberrant crypt focus= aberranter Kryptenfokus
AOM	Azoxymethan
APC	Adenomatous polyposis coli
ATG16L1	Autophagy-related protein 16-1
Bcl-x _L	B cell lymphoma extra large
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAC	Colitis-assoziertes Colonkarzinom
CDK	Cyclin dependent kinase
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
cl-Caspase 3	Cleaved Caspase 3
COX2	Cyclooxygenase 2
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1
DALM	Dysplasia associated lesion or mass
DCC	Deleted in colon cancer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
DNA	Desoxynucleinsäure
DPC4	Deleted in pancreatic cancer 4
DSS	Dextran Sodium Sulfat
ELAM1	Endothelial-leukocyte adhesion molecule
ERK	Extracellular signal regulated kinase
GIT	Gastrointestinaltrakt
IBD1	Inflammatory bowel disease gene 1
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IEC	Intestinal epithelial cells = Intestinale Epithelzellen
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IKK β	I κ B Kinase β
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthetase
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein
JAK	Januskinase
LOH	Loss of heterozygosity
LPS	Lipopolysaccharid
LRRK	Leucine-rich repeat kinase 2
MAP	Mitogen activated protein
MIP2	Makrophagen inflammatorisches Protein 2
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure

mRNA	Messenger Ribodesoxynucleinsäure
Muc2	Mucin 2
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OLFM4	Olfactomedin 4
p-Histon 3	Phosphoryliertes Histon H3
pANCA	Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmatic antibody
Reg	Regenerating islet derived protein
RNA	Ribodesoxynucleinsäure
SCC	Sporadic colon cancer = Sporadisches Colonkarzinom
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TAE	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TAM	Tumor assoziierte Makrophage
TGF β	Transforming growth factor β
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF α	Tumor Nekrosefaktor α

1 Einleitung

Das Immunsystem ist ein überlebenswichtiger Bestandteil des menschlichen Körpers. Es dient der Erkennung und Abwehr von Mikroorganismen, Fremdstoffen und entarteten Zellen. Von essentieller Bedeutung ist hierbei dessen Fähigkeit, zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden und solche Bakterien zu tolerieren, welche in einem symbiotischen oder kommensalen Verhältnis zum Wirt stehen. Um dies zu gewährleisten, müssen entzündungsfördernde und -hemmende Faktoren in einem physiologischen Verhältnis zueinander stehen, da eine dauerhaft überschießende Immunreaktion Gewebe und ganze Organe schädigen kann. Eine Störung dieser sensiblen Balance ist der pathologisch relevante Mechanismus im Geschehen von Autoimmunerkrankungen. In dieser Kategorie existiert eine Vielzahl an Krankheitsbildern, welche in den betroffenen Patienten immense Folgen hervorrufen können. Diese reichen von organspezifischen bis hin zu systemischen Beeinträchtigungen. Die Mehrheit dieser Erkrankungen stammt aus dem sogenannten rheumatischen Formenkreis, wie die Spondylitis ankylosans oder die rheumatoide Arthritis. Weitere bekannte Beispiele sind der Lupus erythematodes, die Sarkoidose oder die Psoriasis.

1.1 Die Gruppe der Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen

Die Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (CED) bilden eine Gruppe von autoimmunologischen Krankheitsbildern, welche sich primär im Gastrointestinaltrakt manifestieren. Zu den häufigsten Vertretern zählen der Morbus Crohn und die Colitis Ulcerosa mit jeweils einer weltweiten Inzidenz von etwa 4 Fällen pro 100000 Einwohner. Die kollagene und lymphozytäre Colitis sind zwei weitere Formen der CED, welche aufgrund ihrer schwierigen und rein mikroskopischen Diagnostizierbarkeit auch als mikroskopische Colitis zusammengefasst werden. Sie kommen im Vergleich zu den beiden erstgenannten Haupttypen allerdings deutlich seltener vor und spielen deshalb klinisch insgesamt eine eher untergeordnete Rolle. Das Hauptmanifestationsalter von Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa liegt im Schnitt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, wobei Frauen tendenziell leicht häufiger betroffen sind als Männer.

Charakteristischerweise kommt es hierbei im Darm zur Entstehung von multiplen Entzündungsherden, welche in ihrem Verlauf entweder kontinuierlich oder rezidivierend in Schüben auftreten können. Beide Krankheitsbilder weisen hinsichtlich der Pathogenese und des klinischen Verlaufs sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf.

Die Colitis Ulcerosa ist eine auf den Dickdarm beschränkte Entzündung, welche sich im gesamten Colon kontinuierlich von distal nach proximal ausbreitet. Das Rektum ist stets betroffen und häufig Ursprungsort der Erkrankung. Im Gegensatz zum Morbus Crohn ist die Tiefenausdehnung der Entzündungsherde lediglich auf die oberflächliche Mucosa-Schicht beschränkt. Im akuten Schub imponiert die hyperämisch und ödematös veränderte Schleimhaut mit fibrinbelegten Ulzerationen und Kryptenabszessen, welche in der histopathologischen Beurteilung als wichtiges differentialdiagnostisches Kriterium gegenüber dem Morbus Crohn gelten. Das Auftreten von rezidivierenden Entzündungsschüben führt im fortgeschrittenen Stadium zu einer progredienten Schleimhautatrophie, welche endoskopisch durch einen Verlust des Faltenreliefs im Dickdarm imponieren kann.

Beim Morbus Crohn ist ein Befall im gesamten Verdauungstrakt von der Mundhöhle bis hin zum Anus möglich. Typischerweise ist initial das terminale Ileum und seltener auch das Colon betroffen. Das Ausbreitungsmuster ist im Gegensatz zur Colitis Ulcerosa nicht kontinuierlich, sondern segmental ausgeprägt. Ein entzündetes Areal ist folglich in seinem Verlauf immer wieder durch Bereiche mit intakter Schleimhaut, den sogenannten *skip lesions*, unterbrochen. In den betroffenen Abschnitten zeigt sich eine transmurale Entzündung aller Wandschichten mit ödematös-fibrotischen Verdickungen und Epitheloidzellgranulomen. Der im Gegensatz zur Colitis Ulcerosa wandüberschreitende Befall zieht die typischen Spät komplikationen wie beispielsweise Darmstenosen, Abszesse, Schleimhautfissuren und organübergreifende Fisteln nach sich.

Die von einer CED betroffenen Patienten leiden unter diffusen Abdominalschmerzen, Tenesmen, Gewichtsverlust und Stuhlnunregelmäßigkeiten, wobei blutige Diarrhoen eher bei der Colitis Ulcerosa auftreten. Darüber hinaus imponiert neben den gastrointestinalen Beschwerden insbesondere der Morbus Crohn mit extraintestinalen Manifestationen, wie z.B. der Primär Sklerosierenden Cholangitis, Uveitiden, Arthritiden

und Hauterscheinungen in Form eines Erythema nodosum oder einer Pyoderma gangraenosum.

1.2 Die Ätiopathogenese der Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen

Die Entstehung und Unterhaltung Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen ist multikausaler Natur. Da die Inzidenzen der CED in Abhängigkeit von geographischer Lage und ethnischer Zugehörigkeit variieren, werden hinsichtlich der Ätiopathologie genetische Dispositionen, Umwelteinflüsse und Lebensführung als Risikofaktoren diskutiert (Xavier and Podolsky 2007). Die Gesamtheit der epidemiologischen Daten hierzu ist bisher allerdings uneinheitlich und deshalb noch wenig aussagekräftig. Trotz bestehender Unklarheiten über die auslösenden Faktoren, trugen die Forschungsergebnisse der letzten Jahre wesentlich zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bei. In diesem Zusammenhang wird für die Initiation und Chronifizierung der Entzündung das Zusammenspiel zwischen einer Barriestörung der Darmschleimhaut und einer entgleisten Immunreaktion gegenüber der enterischen Flora verantwortlich gemacht (Xavier and Podolsky 2007).

Die intestinale Mucosa besteht aus einem dichten Verbund einschichtig angeordneter Epithelzellen, deren apikale Seite mit einem Schutzfilm aus Mucinen und antimikrobiell wirksamen Substanzen überzogen ist. Sie stellt im Gastrointestinaltrakt als erste Schicht einer dreiteiligen Darmwand sowohl physikalisch als auch funktionell-immunologisch die unmittelbare Barriere gegenüber pathogenen bzw. kommensalen Keimen dar und verhindert auf diese Weise deren systemisches Eindringen. Es gibt im Wesentlichen zwei mögliche Ursachen für eine unzureichend intakte Mucosa: eine strukturelle Auflockerung des Epithels durch Versagen der interzellulären Adhäsionen und eine anormale Mucuszusammensetzung durch fehlerhafte Sekretion von Becher- und Paneth-Körnerzellen. Treten diese Faktoren einzeln oder gemeinsam auf, verliert die Darmschleimhaut ihre protektiv-abschirmende Wirkung, was dazu führt, dass das Mucosa-assoziierte Immunsystem vermehrt gegenüber luminalen Antigenen aus Nahrung und Darmflora exponiert wird (Xavier and Podolsky 2007). In einer Studie von Wyatt et al. zeigten Patienten mit Morbus Crohn mehrheitlich eine erhöhte intestinale Permeabilität, welche ebenso mit einer größeren Wahrscheinlichkeit für einen Rückfall von der ruhenden in die aktiv-entzündliche Phase einherging (Wyatt, et al. 1993).

Weiterhin wurde bei CED-Patienten in entzündeten Arealen ein Verlust von *Zonae occludentes*, Adhesive Junctions und Desmosomen beobachtet, was auf eine herabgesetzte Expression der interzellulären Adhäsionsfaktoren, E-Cadherin, α -Catenin, p120 und Occludin zurückzuführen war (Gassler, et al. 2001; Karayiannakis, et al. 1998; Schmitz, et al. 1999). Schließlich lässt sich dieser Umstand auch in genetisch manipulierten Organismen reproduzieren. So entwickeln Mäuse mit einer dominanten, funktionslosen N-Cadherin-Mutation ohne äußeren Einfluss spontan eine Colitis (Hermiston and Gordon 1995). Auch das Eingreifen in die Mucussekretion von Becherzellen durch selektiven Knock-out von Mucin 2 (*Muc2*) führt zum Auftreten einer spontanen Colitis und bestätigt zusätzlich die Wichtigkeit einer luminalen Schutzschicht für das Epithel (Burger-van Paassen, et al. 2012). Da die Durchlässigkeit der Mucosa durch Zytokine von Lamina-propria-Immunozyten beeinflusst wird, unterhält und aggraviert ein aberrant reagierendes Immunsystem ganz im Sinne eines *Circulus vitiosus* zusätzlich diese ursächliche Permeabilitätsstörung. Ein Beispiel dafür liefert das Interleukin IL-17, welches die Formation von Tight-Junctions zu steuern vermag, indem es die Expression von Claudinen induziert (Kinugasa, et al. 2000). Perdue et al. beschrieben weiterhin, dass eine Dysbalance zwischen IL-4 und den proinflammatorischen Zytokinen TNF α und IFN γ zu einem vermehrten transepithelialen Transport von Antigenen führt (Perdue 1999).

In den o.g. Mausmodellen ist ein Schleimhautdefekt bereits ausreichend für die spontane Initiation einer intestinalen Entzündung und deshalb als Wegbereiter für die Entstehung einer CED im Sinne einer vermehrten Exposition des Mucosa-assoziierten Immunsystems gegenüber luminalen Antigenen anzusehen. Da bislang noch keine pathogenen Keime im Geschehen der CED identifiziert wurden, ist dabei von einer gestörten Interaktion zwischen angeborenem Immunsystem und kommensaler Darmflora auszugehen. Normalerweise unterdrücken enterische Abwehrzellen bei Konfrontation mit der Mikroflora proinflammatorische Stimuli und bilden dadurch eine sogenannte *orale Toleranz* aus. In CED beobachtet man hingegen eine Hyperaktivierung des Immunsystems im Darm. Dies ist zum Teil auf eine übersteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B zurückzuführen, welcher zur einer dysregulierten Expression entzündungsfördernder Zytokine, wie TNF α , IL-1 und IL-6 in Makrophagen führt (Atreya, et al. 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass die Unterlaufung der oralen Toleranz bei CED nicht nur auf eine übermäßige Exposition gegenüber

kommensalen Antigenen zurückzuführen ist, sondern auch intrinsische Störungen sowohl im angeborenen als auch im adaptiven Immunsystem zu diesem Umstand beitragen. So befinden sich auch bei intaktem Darmepithel in der Lamina propria von CED-Patienten vermehrt Immunozyten, darunter insbesondere neutrophile Granulozyten, welche dort in der Regel nur in einer geringen Anzahl vorkommen (Malizia, et al. 1991). Dies ist zwar einerseits auf die NF κ B-abhängige Expression von chemotaktischen Botenstoffen wie KC oder MIP2 zurückzuführen (Orlichenko, et al. 2010), andererseits sprechen aber mehrere Hinweise dafür, dass für diesen Umstand sehr wahrscheinlich auch eine fehlgeleitete Interaktion mit vaskulären Endothelzellen verantwortlich ist. So exprimieren mononukleäre Phagozyten, welche aus Mucosabiopsien von CED-Patienten isoliert wurden, übermäßig ICAM1 (Malizia, et al. 1991). Dieses transmembrane Adhäsionsmolekül ermöglicht durch Bindung an endotheliale Integrine die Diapedese von Immunzellen und wird durch proinflammatorische Zytokine hochreguliert. Im Einklang mit diesem Befund wurde bei CED ebenso auf endothelialer Seite eine erhöhte ELAM-1-Expression nachgewiesen (Koizumi, et al. 1992). Dieses Selektin unterstützt genau wie ICAM1 die vaskuläre Transmigration von Leukozyten im Rahmen einer aktiven Entzündung. Interessanterweise wird eine stärkere Bindung zwischen aktivierten Immunoblasten und Endothelzellen auch in Venolen von peripheren Lymphknoten von CED-Patienten beobachtet (Salmi, et al. 1994), weshalb es naheliegend ist, dass die gesteigerte Rekrutierung nicht nur Folge der Wirkung entzündungsfördernder Zytokine ist, sondern durch eine allgemein eingeschränkte Selektivität bei der Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel bedingt sein könnte. Weitere Hinweise für Störungen im angeborenen Immunsystem lieferten genomweite Assoziationsstudien, in welchen das vermehrte Auftreten von hauptsächlich drei mutierten Varianten im sogenannten *IBD1*-Gen bei Morbus-Crohn-Patienten auffiel. Nach einer deutsch-britischen Studie ist das Risiko an einem Morbus Crohn zu erkranken bei Trägern einer *IBD1*-Mutation 2,6-fach und bei Träger von zwei mutierten Allelen um bis zu 40-fach erhöht (Hampe, et al. 2001). Das *IBD1*-Gen ist auf Chromosom 16 lokalisiert und kodiert für das Protein NOD2/CARD15. Neben den intestinalen Epithelzellen, insbesondere Paneth-Körnerzellen, exprimieren auch Makrophagen und dendritische Zellen NOD2. Durch dessen Bindungsstelle für Muramyl-Dipeptid, einem Fragment des Peptidoglykans, erkennt NOD2 intrazelluläre Bestandteile von Bakterien und triggert Signalkaskaden in Zellen des angeborenen Immunsystems. Es stimuliert dabei u.a. die Sekretion von α -Defensinen in Paneth-

Körnerzellen (Lala, et al. 2003) und steuert in antigenpräsentierenden Zellen die NF κ B-Aktivierung durch von Lipopolysacchariden (LPS) stimulierte Toll-like-Rezeptoren und damit die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Inohara, et al. 2005). Wahrscheinlich liegt die Schlüsselstellung von NOD2 in diesem Zusammenhang auch in seiner Beteiligung bei der intrazellulären Immunantwort in Form von Phagozytose und Autophagie (Travassos, et al. 2010). Die Autophagie ist ein Vorgang, welcher zur epithelialen Homöostase beiträgt, indem intrazelluläre Bestandteile, wie Organellen, ungefaltete Proteine und eingedrungene Keime verwertet werden. Neben NOD2 werden neuerdings auch andere am Autophagiekomplex beteiligte Gene, wie *ATG16L1*, *IRGM* und *LRRK* in Zusammenhang mit Morbus Crohn gebracht (Parkes, et al. 2007).

Das adaptive Immunsystem setzt sich auf zellulärer Ebene aus einer heterogenen Gruppe verschiedener B- und T-Lymphozyten zusammen. Im Gastrointestinaltrakt (GIT) übernehmen B-Zellen grundsätzlich die Aufgabe der humoralen Abwehr durch Sekretion von niedermolekularen Immunglobulinen wie IgG oder IgA-Dimeren. Die Population der T-Lymphozyten besteht im Wesentlichen aus den Effektor- bzw. T-Helferzellen Th1 und Th2, sowie den Th17- und regulatorischen T_{reg}-Zellen. Es ist vor allem das lokale Zytokinprofil, welches durch para- und autokrine Stimuli das Differenzierungsmuster im Pool der anwesenden Lymphozyten bestimmt. Die verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine durch Hyperaktivierung des angeborenen Immunsystems bei CED-Patienten beeinflusst deshalb nicht nur die Epithelintegrität, sondern provoziert darüber hinaus auch Störungen in der adaptiven Abwehr. IL-6 beispielsweise hemmt über die Aktivierung von STAT3 die Apoptose von pathologisch aktivierten T-Zellen in CED (Sugimoto 2008). Die erhöhte Expression von IL-6 wiederum ist auf die gesteigerte Aktivität von NF κ B in Makrophagen zurückzuführen (Atreya, et al. 2008). Seitens des adaptiven Immunsystems wird die Proliferation antigen-stimulierter T-Effektorzellen in erster Linie durch regulierende T_{reg}-Zellen supprimiert und dadurch ausbalanciert (Strober, et al. 1998). In Mausmodellen, in welchen entweder eine unzureichende TGF β -Produktion (Gorelik and Flavell 2000), oder ein *Il-10*-Knockout (Kuhn, et al. 1993) eine ausbleibende Induktion von T_{reg}-Zellen bedingt, entwickeln betroffene Tiere eine spontane intestinale Inflammation. Neben einer ausbleibenden Suppression durch T_{reg}-Zellen ist auch eine übersteigerte Reaktivität seitens der aktivierten Lymphozyten zu beobachten. So zeigen von CED-Patienten isolierte T-Lymphozyten *in vitro* eine erhöhte Proliferation nach Stimulation

mit *Staphylococcus aureus* und LPS (Fiocchi, et al. 1981). Weiterhin produzieren T-Lymphozyten in CED vermehrt IL-2 und zeigen zudem eine abnormale Responsivität gegenüber diesem Interleukin durch Überexpression der entsprechenden Rezeptoruntereinheiten IL-2R α und IL-2 β (Matsuura, et al. 1993). IL-2 ist ein entscheidendes Zytokin für die Differenzierung von naiven T-Zellen hin zu Effektorzellen und deren klonaler Expansion nach Antigenstimulation.

Die unterschiedlichen Ausprägungsformen einer CED wurden bislang vereinfacht durch einen dichotomen Ansatz erklärt, nach welchem eine Th1-/Th17-gewichtete Immunantwort zu einem Morbus Crohn bzw. eine übermäßige Th2-Stimulation zu einer Colitis Ulcerosa führt (Xavier and Podolsky 2007). Es wurde erstmalig von Morris et al. an Ratten beschrieben, dass eine mit 2,4,6-Trinitrobenzosulfonsäure (TNBS) induzierte Colitis vom histopathologischen Erscheinungsbild her einem Morbus Crohn entspricht und isolierte Lymphozyten aus betroffenen Arealen dabei ein für Th1- und Th17-Lymphozyten charakteristisches Zytokinprofil bestehend aus INF γ , IL-12, IL-23, IL-17 und IL-2 exprimieren (Morris, et al. 1989). Im Einklang mit diesem Befund attenuiert der Einsatz von IL-12-Antikörpern die dabei auftretende transmurale Entzündung, da dieses Interleukin normalerweise die Differenzierung der Effektorzellen zugunsten der Th1-Population stimuliert (Neurath, et al. 1995). Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde eine Th1-gewichtete Immunantwort beim Morbus Crohn schließlich auch beim Menschen verifiziert (Fuss, et al. 1996; Monteleone, et al. 1997).

Die rektale Applikation von Oxazolone hingegen provoziert ganz im Sinne einer Colitis Ulcerosa eine eher oberflächliche Entzündung mit T-Lymphozyten, welche unter Stimulation mehrheitlich Th2-typische Interleukine wie IL-4 und IL-5 produzieren (Boirivant, et al. 1998). Darüber hinaus beteiligen sich Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) durch Sekretion von IL-13 an der Lymphozytendifferenzierung im Sinne einer Th2-Stimulation (Heller, et al. 2002). Beim Menschen wird das für die Colitis Ulcerosa postulierte Konzept einer Th2-betonten Überreaktion größtenteils eher durch indirekte Befunde gestützt, als dass man eine Überexpression des für Th2-Zellen typischen Interleukins IL-4 in entsprechenden Biopsien nachweisen könnte. In Patientenserum von Colitis-Ulcerosa-Patienten kommen beispielsweise erhöhte Titer autoreaktiver Antikörper, insbesondere pANCA häufiger vor als beim Morbus Crohn (Saxon, et al. 1990), was dadurch begründet sein kann, dass Th2-Helferzellen anders als Th1-Zellen vorzugsweise an der Induktion einer humoralen Immunantwort durch B-Zellen

mitwirken. Die dabei entstehenden Plasmazellen produzieren abhängig vom Typ der induzierenden T-Helferzelle unterschiedliche IgG-Subtypen. Auch in diesem Punkt sprechen die Befunde für die jeweils typische Signatur der jeweiligen T-Helferzellklasse, da bei der Colitis Ulcerosa mehrheitlich die Th2-induzierten Klassen IgG1 und IgG4 vorkommen, während beim Morbus Crohn das der Th1-Antwort entsprechende IgG2 vorherrscht (Kett, et al. 1987).

1.3 Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen und das Colitis-assoziierte Colonkarzinom - Eine Verbindung zwischen Entzündung und Tumorigenese

Es ist schon seit langem bekannt, dass zwischen Entzündung und Tumorigenese eine enge Verbindung besteht. Bereits 1863 beschrieb Rudolf Virchow in seiner Reiztheorie das Auftreten von „lymphoretikulären Infiltraten“ als Ausdruck chronischer Entzündung in malignen Neoplasien. Als Verursacher einer chronischen Entzündung kommen hierbei Infektionen, exogene Noxen aber auch Autoimmunkrankheiten in Frage. Man findet heute eine Fülle epidemiologischer Daten, welche Assoziationen zwischen diversen Tumorentitäten und inflammatorischen Einflüssen belegen, wobei insbesondere Infektionskrankheiten mit ca. 15 % aller Tumorfälle weltweit einen Großteil verursachen (Trichopoulos 1999). Bekannte Beispiele sind der Zusammenhang zwischen *Helicobacter-pylori*-Infektionen mit MALT-Lymphomen im Magen, chronisch viralen Hepatitiden und Hepatozellulären Karzinomen, HPV-Infektionen als Risikofaktor für Zervixkarzinome und langjähriger Nikotinabusus als Mitverursacher von Bronchialkarzinomen. Unter den Krankheiten autoimmunologischer Natur gehen die Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen überdurchschnittlich häufig mit intestinalen Neoplasien als Spätkomplikation einher. Sie sind in diesem Zusammenhang besonders hervorzuheben, da der Gastrointestinaltrakt von allen Organen am empfänglichsten für chronische Entzündungen und Entzündungs-assoziierte Tumore ist (Balkwill and Mantovani 2001). Im Schnitt entwickeln mehr als 20 % der CED-Patienten mit einer chronischen Colitis innerhalb von 30 Jahren ein Colitis-assoziiertes Colonkarzinom (CAC) (Lakatos and Lakatos 2008). Das Risiko für die Entwicklung einer colorektalen Neoplasie hängt dabei von mehreren Variablen ab. Hierzu zählen das Alter der Patienten, die Erkrankungsdauer, so wie Lokalisation, Ausbreitung und Schweregrad der Inflammation (Rutter, et al. 2004). Des Weiteren sind

die Primär Sklerosierende Cholangitis und die Backwash-Ileitis spezielle Risikofaktoren beim Krankheitsbild der Colitis Ulcerosa (Rutter, et al. 2004).

Karzinome entwickeln sich dreistufig aus einer Abfolge von Initiation, Promotion und Progression. Im Verlauf dieser Phasen ist die zelluläre Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressor- bzw. Protoonkogenen die Ursache für die Transformation von normalem in entartetes Gewebe. Versagen die zelleigenen Reparaturmechanismen, persistieren diese Mutationen und führen über einen fehlregulierten Zellzyklus bzw. eine ausbleibende Apoptose zu unkontrolliertem Wachstum der betroffenen Zellen. Das CAC und die sporadische Form des Dickdarmkarzinoms (engl. *SCC=Sporadic Colon Cancer*, Sporadisches Colonkarzinom) ähneln sich in ihrer Pathogenese zum Teil in den molekularen Ereignissen, es bestehen allerdings Unterschiede hinsichtlich deren Abfolge und Kausalität (Ullman and Itzkowitz 2011). Man spricht deshalb beim CAC von einer Dysplasie-Karzinom- und beim SCC von einer Adenom-Karzinom-Sequenz. Die als Vorstufe zum Karzinom geltende Dysplasie bezeichnet analog zu einem Adenom ein Areal, in welchem normales Epithel durch entartete, aber noch nicht invasive Zellen ersetzt wurde. In der histologischen Beurteilung klassifiziert man die Läsion je nach Ausprägungsgrad als eine unbestimmbare, eine *low grade* oder eine *high grade* Dysplasie.

In der Initiationsphase eines SCC sind zunächst v.a. spontane DNA-Mutationen ausschlaggebend, welche zu einer konstitutiven Aktivität des Wnt-Signalwegs führen. Dies geschieht zum einen durch konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors β -Catenin und Wnt selbst, im Wesentlichen aber durch Inaktivierung des β -Catenin-Inhibitors APC (Morin, et al. 1997). Die Folge eines Verlusts beider APC-Alle ist demnach eine ungehemmte Translokation von β -Catenin in den Zellkern mit konsekutivem Differenzierungs- und Migrationsstopp prämaligener Epithelzellen, welche anstatt ins Darmlumen abgeschilfert zu werden in der Mucosa verbleiben. Hierdurch bilden sich aberrante Epithelzellformationen, sogenannte *aberrant crypt foci* (ACF), in den Colorkrypten aus (Terzic, et al. 2010). Im CAC hingegen tritt ein Funktionsverlust von APC wesentlich seltener oder erst in der späteren Entwicklung des Tumors auf (Aust, et al. 2002). So werden in weniger als 14 % der Fälle Mutationen im APC-Gen auf der Stufe von *low-grade*-Dysplasien bis hin zu Karzinomen detektiert (Aust, et al. 2002).

Früher als beim SCC tritt bereits in der Initiationsphase eines CAC ein Ausfall des Tumorsuppressorproteins p53 auf, welches zelluläre DNA-Schäden und das Überleben intestinaler Epithelzellen kontrolliert. Gegenüber 40-50 % beim SCC sind in 50-80 % aller CAC immunhistochemisch mutierte p53-Proteine nachweisbar (Brentnall, et al. 1994; Ullman and Itzkowitz 2011). Beim SCC spielt p53 offenbar erst später bei der Progression des Adenoms in ein Karzinom eine Rolle und beeinflusst Invasivität, so wie Metastasierung des Tumors durch Induktion der Epithelialen-mesenchymalen Transition (Schwitalla, et al. 2013). Ein Verlust der Heterozygotität (*Loss of heterozygosity*, LOH) von p53 korreliert auch beim CAC mit der Malignität des Tumors (Burmer, et al. 1992). Interessanterweise tritt der Verlust der p53-Funktion bereits vor der Bildung von Neoplasien in entzündeten Arealen auf, was darauf hindeutet, dass die chronische Inflammation selbst das Auftreten der p53-Mutationen verursacht, wodurch es makroskopisch zur Bildung von flachen, nicht-polypösen Dysplasien kommt (Hussain, et al. 2000; Cooks, et al. 2013).

Anderweitige Mutationen in der Dysplasie- bzw. Adenom-Karzinom-Sequenz umfassen u.a. die Aktivierung der Protoonkogene *KRAS* und *BRAF*, die Inaktiveringung der Tumorsuppressorproteine DCC/DCP4 und des TGF β -Signalweges (Grady and Carethers 2008). Während der gesamten Karzinogenese wird das Zustandekommen und die Persistenz der Mutationen von einem gleichzeitig vorhandenem Verlust der genomischen Stabilität gebahnt (Stoler, et al. 1999). Es sind vor allem Defekte in Zellzykluskontrollpunkten und DNA-Reparaturenzymen, welche eine Instabilität in Chromosomen und Mikrosatelliten verursachen.

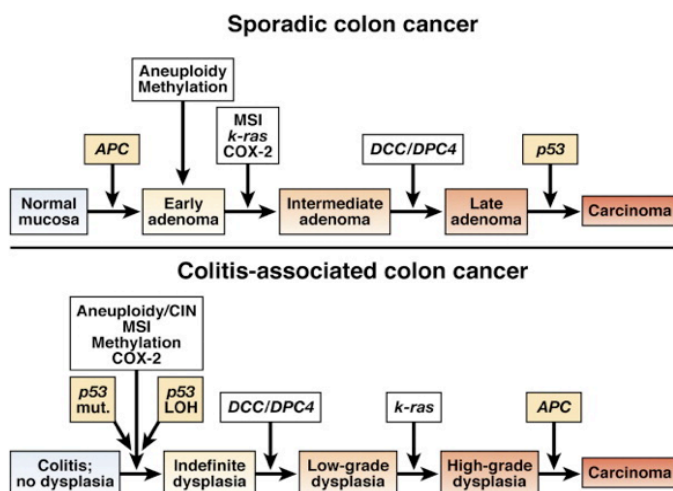


Abb. 1 Unterschiede in der Entwicklung eines CAC und SCC nach Ullman et al.

MSI= microsatellite instability, APC= adenomatous polyposis coli, DCC/DPC4= deleted in colon cancer/deleted in pancreatic cancer 4, k-ras= Kirsten-ras

Die Stadien in der Dysplasie- bzw. Adenom-Karzinom-Sequenz werden vom tumorassoziierten Gewebe, insbesondere dem angeborenen und adaptiven Immunsystem beeinflusst. In soliden Neoplasien findet man hierbei eine ganze Gruppe von Leukozyten vor, darunter Gewebsmakrophagen, Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), dendritische Zellen, Neutrophile Granulozyten, Mastzellen und T-Zellen. Das Wirkspektrum der einzelnen Immunkomponenten ist dabei sehr komplex und inhomogen. Vereinfacht ausgedrückt sind es vor allem Mechanismen der angeborenen Immunantwort, welche sich förderlich auf die Tumorigenese auswirken, während das adaptive System eine vorwiegend tumorsuppressive Funktion ausübt (Karin and Greten 2005). Während beim CAC myeloische Zellen aufgrund der chronischen Colitis bereits vor der Tumorentstehung vorhanden sind, werden sie beim SCC erst als Reaktion auf den Tumor rekrutiert. Die langfristige Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-23, TNF α und CXCL-8 durch myeloische Zellen verursacht in Enterozyten kumulative DNA-Schäden durch die COX2- bzw. iNOS-abhängige Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (Gupta and Dubois 2001). Darüber hinaus aktivieren die o.g. Zytokine Gene, welche zur Resistenz gegenüber der Apoptose und damit der Progression des Tumors beitragen (Balkwill and Mantovani 2001). Eine wichtige

Schlüsselstellung nimmt hierbei die klassische, IKK β -abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B durch die entzündungsfördernden Zytokine ein. Greten et al. konnten anhand zellspezifischer IKK β -Deletion demonstrieren, dass NF κ B in einem murinen CAC-Modell die Inhibition der Apoptose in Enterozyten induziert und dadurch zur erhöhten Tumorinzidenz beiträgt (Greten, et al. 2004). Im tumorassoziierten Gewebe wiederum aktiviert NF κ B in Makrophagen eine Reihe von Genen, welche zur Ausbreitung des Tumors beitragen und im Wechselspiel mit Enterozyten den Circulus vitiosus im Geschehen eines CAC aggravieren. Ein anderer Mechanismus, welcher ähnlich wie die klassische NF κ B-Aktivierung zur Apoptoseresistenz im CAC beisteuert, ist die gp130-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch die Interleukine IL-6 und IL-11. Nach Bollrath et al. greift STAT3 durch Aktivierung antiapoptotischer Proteine wie Bcl-x_L und Survivin direkt in die Kontrollpunkte G1 bzw. G2/M im Zellzyklus ein und ist somit ein weiterer Faktor in der Pathogenese eines CAC, welcher die Akkumulation dysplastisch entarteter Epithelzellen begünstigt (Bollrath, et al. 2009).

Die molekularen Unterschiede in der Pathogenese eines CAC und SCC prägen den mikro- und makroskopischen Phänotyp präneoplastischer Läsionen und Karzinome. Bei Betrachtung der histologischen Typen eines CAC stellen zwar Adenokarzinome den Großteil da, dennoch kommen im Gegensatz zum SCC verhältnismäßig häufiger schlecht differenzierte Formen, wie das anaplastische, muzinöse und Siegelringzellkarzinom vor (Potack and Itzkowitz 2008). Ebenso sind die präneoplastischen Läsionen in Abhängigkeit vom Schweregrad der Inflammation zunehmend flach und nicht polypös wie die meisten Adenome beim SCC (Rutter, et al. 2004). Sie sind makroskopisch in der Endoskopie häufig schwieriger als Adenome zu erkennen, da sie zum einen in entzündeter Darmschleimhaut schlechter auffallen und zum anderen erhaben in Form von *dysplasia associated lesions or masses* (DALM) oder flach auftreten. Dies macht ihre Früherkennung im endoskopischen Screening besonders schwierig und stellt ein Hauptproblem in der sekundären Prävention eines CAC da (Potack and Itzkowitz 2008).

1.4 Synopsis über das Regenerating-islet-derived-Protein 3 beta (Reg3 β)

Reg3 β ist ein 16 kDa schweres, sekretorisches Protein, welches zur Familie der sogenannten *regenerating islet derived proteins* (Reg) zählt. In Versuchsreihen an Ratten wird häufig auch die alternative Bezeichnung *Pankreatitis-assoziiertes Protein 1* (PAP1) verwendet. Die Reg-Familie besteht aus insgesamt vier Gruppen von gewebsspezifischen Isotypen, welche lediglich strukturell, aber nicht funktionell mit den C-Typ-Lektinen verwandt sind. Dabei werden die Typen Reg1 und Reg2 ausschließlich pankreasspezifisch exprimiert, während Reg3 α , Reg3 β , Reg3 γ und Reg4 im gesamten GI-Trakt vorkommen (Narushima, et al. 1997). Wie aus dem Namen bereits hervorgeht, werden die Reg-Proteine vorwiegend mit einer regenerativen Wirkung in Verbindung gebracht. Diese Eigenschaft zeigte sich zuerst in pankreatischen Beta-Zellen (Okamoto 1999), wurde aber auch weiterhin im Rahmen der Leberzellregeneration (Simon, et al. 2003), der Neurogenese (Marz-Weiss, et al. 2011) und dem Wachstum intestinaler Epithelzellen (Moucadel, et al. 2001) nachgewiesen.

Im intestinalen Epithel produzieren Enterozyten, neuroenteroendokrine und Becherzellen das Lektin Reg3 β (Burger-van Paassen, et al. 2012), wobei die Expression im Dünndarm insgesamt stärker ausgeprägt ist als im Dickdarm (Christa, et al. 1996). Interessanterweise wird in enterischen Entzündungsprozessen mehrfach ein gesteigertes Vorhandensein von Reg3 β festgestellt. So kann sowohl bei Patienten mit einer Chronisch Entzündlichen Darmerkrankung, als auch in experimentell induzierten Colitiden im Mausmodell, eine zunehmende Expression von Reg3 β beobachtet werden, welche histologisch mit einer Meta- bzw. Hyperplasie von Paneth-Körnerzellen einhergeht (Bollrath, et al. 2009; Gironella, et al. 2005). Interessanterweise korrelieren dabei die gemessenen Serum-Plasma-Konzentrationen von Reg3 β bei CED-Patienten mit dem Schweregrad der Erkrankung (Gironella, et al. 2005). Das vermehrte Vorkommen von Reg3 β im Rahmen dieser inflammatorischen Prozesse ist hauptsächlich auf die Stimulation intestinaler Epithelzellen durch eine Reihe von Entzündungsmediatoren zurückzuführen. Hierunter finden sich IFN γ , das proinflammatorische Zytokin IL-6, aber auch antiinflammatorische Zytokine aus der IL-10-Familie, wie IL-22 und IL-10 selbst (te Velde et al., 2007; Zheng et al., 2008). Die bisherigen Forschungsarbeiten legen dabei den Schluss nahe, dass Reg3 β sich im Rahmen dieser Entzündungen an der Wiederherstellung der intestinalen

Zellhomöostase durch regenerative, antimikrobielle und antiinflammatorische Funktionen beteiligt (Moucadel, et al. 2001; Gironella, et al. 2005; Burger-van Paassen, et al. 2012; van Ampting, et al. 2012). Die Untersuchungen des Signalweges von Reg3 β an pankreatischen AR42J-Zellen liefern hierzu plausible Erklärungsansätze. Diesbezüglich ist bislang bekannt, dass der transmembrane Rezeptor von Reg3 β an seiner intrazellulären Domäne an Januskinasen gekoppelt ist und nach deren konsekutiver, gegenseitiger Phosphorylierung Mitglieder aus dem MAP-Kinaseweg involviert werden (MAP engl. *mitogen activated protein*) (Ferrés-Masó, et al. 2009). Am Ende dieser mehrstufigen Signalkaskaden werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche u.a. zelluläres Wachstum, Differenzierung und Apoptose regulieren. Im Falle der Januskinase (JAK) kommt es hierbei zur Phosphorylierung von STAT3-Monomeren, welche als Homodimere in den Zellkern transloziert werden um dort ihre transkriptionelle Aktivität zu entfalten (Closa, et al. 2007). Die Promotorregion von Reg β besitzt wiederum selbst ein STAT3-responsives Element, weswegen sich die Signalkaskade durch positive Rückkopplung in ihrer Wirkung selbst verstärkt (Closa, et al. 2007).

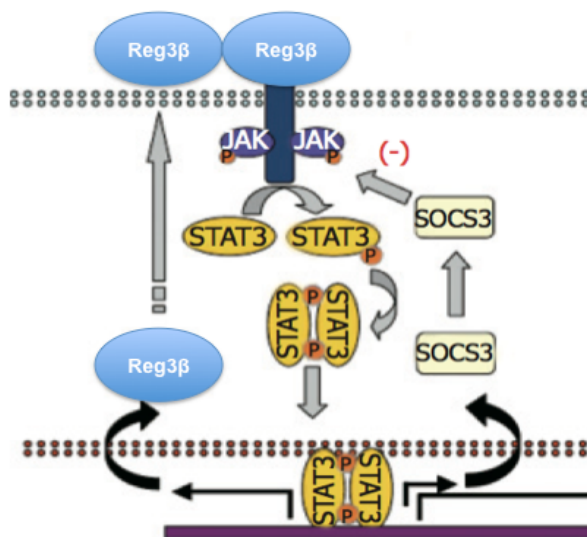


Abb. 2 Signalkaskade von Reg3 β , abgewandelt nach Closa et al.

SOCS3= Suppressor of cytokine signalling 3; STAT3= Signal transducer and activator of transcription 3;

Zusätzlich wird STAT3-abhängig das antiinflammatorische Molekül SOCS3 induziert, welches neben der Inhibition der JAK-Aktivität anderweitig auch entzündungshemmende Funktionen ausübt (Closa, et al. 2007). Es ist somit naheliegend, dass die Achse Reg3 β /STAT3/SOCS3 an der Attenuierung intestinaler Entzündungen beteiligt ist. Beispielsweise konnte für das Interleukin IL-22 gezeigt werden, dass es eine protektive Wirkung im Rahmen einer experimentellen Colitis besitzt und dabei gleichzeitig die STAT3-vermittelte Expression von Reg β induziert (Zhang, et al. 2008). Des Weiteren sind die Elemente im Reg3 β -Signalweg nahezu identisch mit denjenigen des antiinflammatorischen Interleukins IL-10, weswegen sich beide Botenstoffe in ihrer Wirkung sehr ähneln. So inhibieren beide Mediatoren *in vitro* die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B und darüber hinaus auch die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Folch-Puy, et al. 2006; Gironella, et al. 2005). Die Zusammenschau dieser Befunde legt den Schluss nahe, dass Reg3 β aufgrund dieser Eigenschaften möglicherweise als wichtiges Stellglied agiert, welches den ätiopathogenetisch relevanten Faktoren einer CED entgegenwirken kann.

Neben den Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen weisen diverse gastrointestinale Tumorentitäten, wie das Magen-, Pankreas- und Colonkarzinom ebenfalls ein vermehrtes Vorhandensein von Reg3 β auf (Motoo, et al. 1998; Rosty, et al. 2002). Analysen von Biopsien humaner, sporadischer Colonkarzinome ergaben zwar keinen Zusammenhang zwischen der Expression von Reg3 β und dem klinischen Schweregrad, jedoch bestand eine Korrelation zwischen hohen Serum-Reg3 β -Konzentrationen und höheren S-Phase-Fractionen neoplastischer Zellen im Tumor (Cao, et al. 2009). In einem murinen CAC-Modell konnten Bollrath et al. zeigen, dass STAT3 in intestinalen Epithelzellen zur Persistenz maligne entarteter Zellen beiträgt indem es die Expression einer Gruppe von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-x_L, Survivin und Hsp70 anregt (Bollrath, et al. 2009). Gleichzeitig war in den entsprechenden neoplastischen Arealen auch das Lektin Reg3 β überexprimiert (Bollrath, et al. 2009). Da Reg3 β durch STAT3 induziert wird und in pankreatischen Azinuszellen nach Stimulation mit TNF α selbst über den MEK1-ERK1/2-Signalweg inhibierend auf die Apoptose wirkt, könnte dieser Mechanismus auch beim CAC eine Rolle spielen (Malka, et al. 2000). Der genaue Wirkungsweise über welche das Protein Reg3 β im

Rahmen eines CAC einen Einfluss auf die Tumorigenese ausübt, ist allerdings noch unklar.

1.5 Das transgene Mausmodell

Um Aufschlüsse über die Wirkungsweise eines Proteins in einem genetisch modifizierten Organismus gewinnen zu können, bedient man sich häufig der Methode der transgenen Überexpression. Hierbei konstruiert man zunächst ein Fusionsgen, welches in 5'-3'-Ablese-richtung aus einem zellspezifischen Promoter, dem für das Protein kodierendem DNA-Abschnitt und abschließend einer terminierenden Polyadenylierungssequenz besteht. Dieses Genkonstrukt wird in rekombinanter Technik vervielfältigt und in befruchtete Oozyten oder Blastozysten injiziert, wo sich die Kopien des Transgens an zufälliger Stelle in das Genom integrieren. Die mehrfach vorhandenen Kopien im Genom verursachen in den manipulierten Zellen eine Überexpression des entsprechenden Proteins, weshalb man bei dieser Art der Manipulation von einer *gain-of-function*-Mutation spricht. Für das Einbringen der Fremd-DNA haben sich bisher zwei Methoden etabliert, welche sich im Wesentlichen darin unterscheiden, welcher Zelltyp vor oder zu Beginn der Embryogenese mit der rekombinanten DNA transfiziert wird. Bei der pronukleären Mikroinjektion wird die DNA in eine befruchtete Eizelle noch vor der Verschmelzung der väterlichen und mütterlichen Pronuclei eingebracht. Um sich in die haploiden Chromosomen integrieren zu können, wird die klonierte Fremd-DNA dabei üblicherweise von Vektorsequenzen befreit, linearisiert und mit einem speziellen Injektionspuffer vermischt. Die Oozyten selbst gewinnt man nach Stimulation der weiblichen Tiere mit Gonadotropinen. Im Anschluss an die Injektion werden die Zygoten in den Uterus eines scheinsschwangeren Weibchens implantiert und die Nachkommenschaft durch DNA-Analyse hinsichtlich der Transgenität selektiert. In Abhängigkeit von der Reinheit, Konzentration und Größe des Fusionsgens kann unter den Jungtieren mit einer Ausbeute von ca. 10 bis 40 % Mutanten gerechnet werden (Diego Retrieved 21 February 2013). In seltenen Fällen kann es passieren, dass das Fusionsgen erst nach der ersten Zellteilung und somit nicht mehr im pronukleärem Stadium in das Genom integriert wird. Die Folge davon ist, dass das Transgen nicht in allen Zelllinien exprimiert wird, weshalb man bei solchen Tieren von einem Mosaik spricht.

Alternativ zur pronukleären Mikroinjektion können auch pluripotente Stammzellen transfiziert werden. Man gewinnt diese aus Blastozystenansammlungen während der frühen Phase der Embryogenese. Die Stammzellen lassen sich hier bereits vor der Implantation mit einem DNA-Screening hinsichtlich der gewünschten Mutation ausselektieren. Da man hier die Fremd-DNA in einem fortgeschrittenerem Stadium während der Entwicklung des Embryos einbringt und folglich nicht jede Stammzelle das manipulierte Genom besitzt, entwickeln sich hieraus zunächst sogenannte Chimären. Insofern die Keimzellen eines Chimären die Mutation tragen, erhält man in anschließenden Verpaarungen mit Wildtypen vollständige Mutanten.

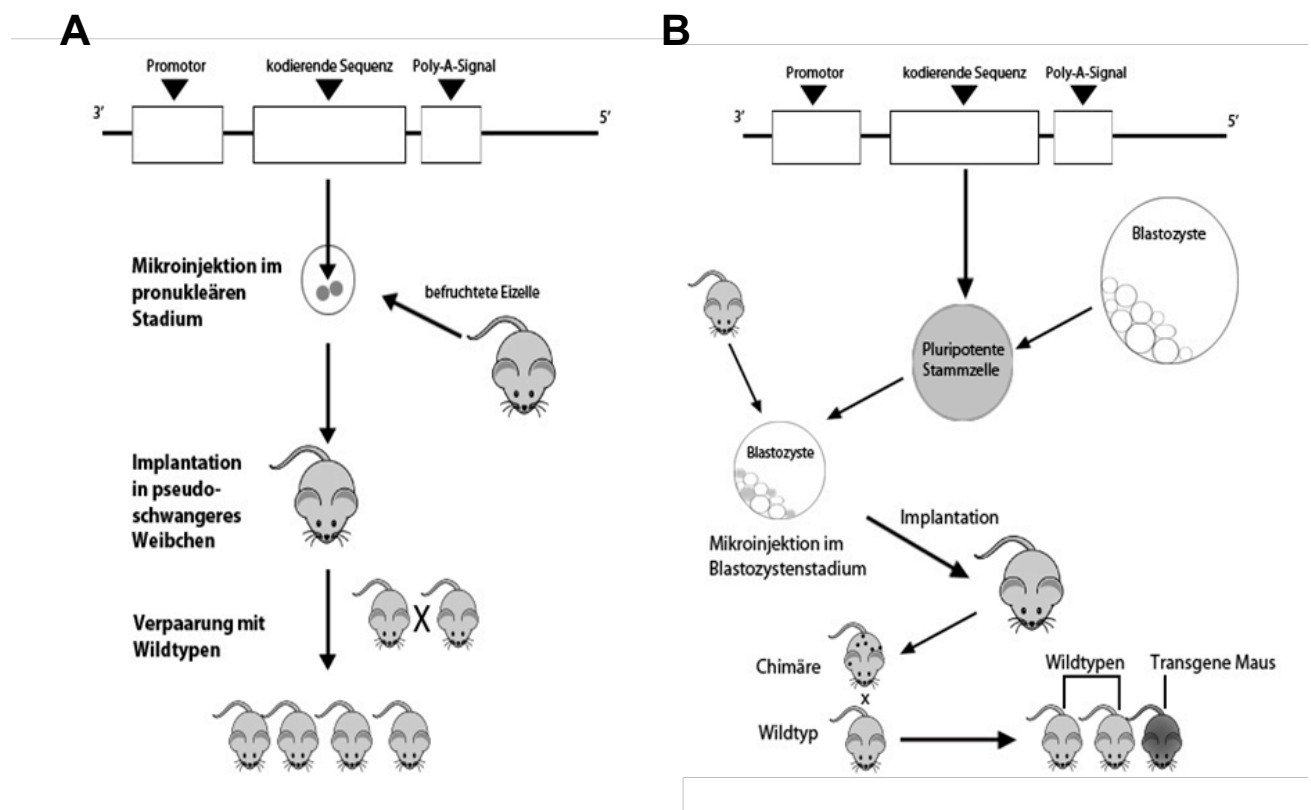


Abb. 3 Schematische Gegenüberstellung der Mikroinjektion während des pronukleären bzw. Blastozystenstadiums

(A) Pronukleäre Mikroinjektion. (B) Mikroinjektion in pluripotente Stammzellen

Selbst wenn die Integration des Fusionsgens durch Nachweis auf DNA-Ebene bestätigt wurde, so ist dessen Expression dadurch immer noch nicht sichergestellt, da die

Integrationspositionen im Genom rein zufällig sind und das Transgen dementsprechend durch die Umgebung des DNA-Abschnitts unvorhergesehen beeinflusst werden kann (*position effect variegation*). Der Grad der Genexpression in den einzelnen Mauslinien kann deshalb sehr unterschiedlich ausfallen. Beispielsweise führen in Heterochromatin integrierte DNA und kurze, im Fusionsgen verbliebene Vektorsequenzen zu einer ausbleibenden Transkription bzw. einem Transkriptionsstopp. Auf der anderen Seite können heterologe Introns in der Umgebung des Fusionsgens eine verstärkte Transkription verursachen. Letzten Endes erlangt man Sicherheit über die erfolgreiche transgene Expression durch den Nachweis auf Protein- oder mRNA-Ebene aus isoliertem Gewebe der Mutanten.

1.6 Mausmodelle für die chemische Induktion einer Colitis bzw. eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms

Es existiert eine Vielzahl an unterschiedlichen Mausmodellen, an welchen intestinale Entzündungsprozesse untersucht werden können. Die jeweiligen Modelle repräsentieren hierbei nie die gesamte Komplexität von CED, weswegen sie Studien an Patienten und menschlichem Geweben nicht vollständig ersetzen können. Dennoch eignen sie sich für die Aufklärung pathophysiologischer Teilaspekte und die präklinische Evaluierung therapeutischer Ansätze. Für die Provokation einer intestinalen Entzündung kommen im Wesentlichen chemische Substanzen, der Immunzelltransfer, genetische Manipulationen oder eine Kombination aus diesen drei Ansätzen zum Einsatz. Je nach verwandter Methode wird im Mausmodell die mucosale Integrität beeinträchtigt und/oder in die Mechanismen der angeborenen bzw. adaptiven Immunantwort eingegriffen. Beispiele für Manipulationen im angeborenen Immunsystem sind die selektive Ablation von STAT3 sowohl in Makrophagen (Takeda, et al. 1999) als auch in colonischen Epithelzellen (Alonzi, et al. 2004), oder die ubiquitäre Defizienz im cytoplasmatischen Protein A20, welches normalerweise die TNF α induzierte NF κ B-Aktivierung inhibiert (Lee, et al. 2000). Im Hinblick auf die Involvierung unterschiedlicher T-Zell-Klassen bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa gibt es ebenfalls verschiedene Möglichkeiten, intestinale Entzündungen mit Th1- oder Th2-gewichteter Beteiligung zu induzieren. *Il10*^{-/-}-Mäuse beispielsweise entwickeln unter der absoluten Defizienz des antiinflammatorischen Interleukins IL-10 spontan nach zwei bis drei Monaten eine Th1-

polarisierte Enterocolitis, welche hinsichtlich der pathognomischen Kriterien dem Morbus Crohn sehr stark ähnelt (Rennick, et al. 1997). Hierbei wurde beobachtet, dass die von der Th1-Subpopulation bedingte Überproduktion von IFN γ zur Ausbildung diskontinuierlicher Läsionen in Dün- und Dickdarm führt. Interessanterweise werden bei einem Großteil betroffener Tiere in im Dickdarm befallenen Arealen nach ca. sechs Monaten Karzinome beobachtet (Berg, et al. 1996). Ein weiteres Beispiel für eine spontan Th1-gewichtete Colitis ist die transgene Überexpression von STAT4, einem Transkriptionsfaktor in der IL-12-/IL-23-Signalkaskade (Wirtz and Neurath 2007). In *Tcr α ^{-/-}*-Mäusen verursacht ein funktionsloser T-Zell-Rezeptor hingegen eine Th2-dominierte Immunantwort (Wirtz and Neurath 2007).

Neben Manipulationen der immunologischen Komponenten stehen darüber hinaus auch solche Modelle zur Verfügung, in welchen die Störung der epithelialen Homöostase eine intestinale Inflammation triggert. Neben genetischen Veränderungen, welche beispielsweise zu einem Funktionsverlust des Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin (Hermiston and Gordon 1995) führen, stehen hierfür eine Reihe chemischer Substanzen zur Verfügung, darunter 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS), Oxazolon und Dextransodiumsulfat (DSS) (Hermiston and Gordon 1995; Panwala, et al. 1998). TNBS und Oxazolon werden rektal appliziert und besitzen eine haptensierende Wirkung auf Auto- oder mikrobielle Antigene im Dickdarm. Mit beiden Substanzen wird eine chronische Colitis provoziert, in welcher je nach eingesetzter Mauslinie unterschiedliche CD4⁺ T-Helferzell-Subtypen involviert sind (Wirtz, et al. 2007). SJL/J-Mäuse beispielsweise entwickeln unter Provokation mit TNBS eine Th1-betonte Colitis, während man in derselben Mauslinie bei Verwendung von Oxazolon im distalen Dickdarm eine Th-2-gewichtete Entzündung mit Charakteristiken einer Colitis Ulcerosa beobachten kann (Neurath, et al. 1995; Wirtz, et al. 2007). Während TNBS und Oxazolon durch eine immunologische Überreaktion sekundär einen Epithelschaden verursachen, wirkt DSS, ein oral verabreichtes Agens, direkt zytotoxisch bzw. Apoptose-induzierend auf intestinale Epithelzellen. Als Folge hiervon entwickeln die Versuchstiere eine akut-ulzerierende Colitis, welche mit blutigen Diarrhoen, so wie Granulozyteninfiltraten einhergeht und histopathologisch dieselben Charakteristiken wie eine Colitis Ulcerosa aufweist (Cooper, et al. 1993; Okayasu, et al. 1990). Nach einem initialen Kryptenverlust folgt eine Regenerationsphase, welche durch Zeichen der mucosalen Atrophie, wie Verkürzungen und Aufzweigungen der Krypten (*crypt*

branching) imponiert (Clapper, et al. 2007). In der Frühphase beteiligen sich hierbei weder B- noch T-Zellen am Entzündungsgeschehen, weswegen sich dieses Modell für die Untersuchung der Mechanismen des angeborenen Immunsystems im akuten Stadium einer Colitis eignet (Dieleman, et al. 1994). In dieser Phase dominieren bezüglich der mRNA-Expression vorwiegend die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α und die chemoattraktiven Stoffe KC und MIP2 (Perse and Cerar 2012). Bei der Verwendung von DSS ergeben sich im Wesentlichen zwei Vorteile gegenüber TNBS und Oxazolone: zum einen ist für die Suszeptibilität gegenüber dem Agens keine genetisch modifizierte Mauslinie notwendig und zum anderen lassen sich durch die Gabe in Form von Zyklen aktive Entzündungen und Regenerationsphasen alternieren, wodurch sich der klinische, schubförmige Verlauf einer Colitis Ulcerosa sehr gut simulieren lässt.

Bei repetitiver Gabe bildet sich im DSS-Modell eine chronische Colitis mit gemischter Beteiligung von Th1- bzw. Th2-Zellen aus (Dieleman, et al. 1998). Mit einer ähnlich großen Inzidenz wie bei Colitis-Ulcerosa-Patienten kommt es hierbei zur Entwicklung von Karzinomen im Colon, allerdings bestehen hinsichtlich mancher histopathologischer Kriterien Unterschiede gegenüber der humanen Form des CAC. So kommen zum einen Mutationen im p53-Gen nur in 14,2 % aller Dysplasien vor und zum anderen entwickeln sich aus diesen prämaligen Läsionen auch seltener Karzinome (Clapper, et al. 2007). Bei der Kombination einer DSS-Behandlung mit der Applikation von Azoxymethan (AOM), 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) oder Eisen, treten Karzinome im Laufe einer Colitis wesentlich häufiger und mit einer kürzeren Latenzphase auf. AOM erweist sich von allen Substanzen dabei als sehr praktikabel, da bereits ein einzelner, siebentägiger Zyklus mit 2 %-igem DSS ausreicht um Tumore in einer relativ kurzen Zeit von 20 Wochen mit einer Inzidenz von 100 % auftreten zu lassen (Clapper, et al. 2007). AOM wirkt direkt karzinogen, indem es Mutationen sowohl im *KRAS*-, als auch *CTNNB1*-Gen induziert und dadurch zur Stabilisierung der beiden Transkriptionsfaktoren führt. Im Falle von *CTNNB1* schützt eine Veränderung im Exon 3 β -Catenin vor der proteolytischen Degradation, wodurch der Wnt-Signalweg konstitutiv aktiv wird (Greten, et al. 2004). Dies bedingt zum einen die Entstehung dysplastischer und hyperproliferativer Veränderungen und zum anderen die vermehrte Expression der Enzyme COX2 und iNOS (Takahashi and Wakabayashi 2004). Im Gegensatz zum humanen CAC kommen beim AOM/DSS-Modell keine deletären Mutationen für den

Tumorsuppressor p53 vor. In der Initiationsphase eines CAC wird ein Funktionsverlust von p53 in Zusammenhang mit der Entwicklung flacher (nicht-polypöser) Dysplasien gebracht (Cooks, et al. 2013). Weiterhin spielt p53 in der Progressionsphase von der Dysplasie zum Karzinom eine Rolle und beeinflusst Invasivität, so wie Metastasierung des Tumors (Schwitalla, et al. 2013). Dies erklärt, warum auch die Metastasierungsrate der Karzinome im AOM/DSS-Modell geringer ausfällt als bei Patienten mit CAC (Kanneganti, et al. 2011). Trotz dieser Unterschiede ist die Induktion mit AOM/DSS ein einfach anzuwendendes und weit verbreitetes Modell für die Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen beim CAC.

2 Zielsetzung

Eine Barrierestörung der Darmschleimhaut und eine inadäquate Immunreaktion sind zwei wesentliche Faktoren in der Pathogenese von CED. Diese bergen in ihrem Verlauf das Risiko für die Entstehung von intestinalen Neoplasien, insbesondere des Colitis- assoziierten Colonkarzinoms. Es gibt Hinweise dafür, dass das sekretorische Lektin Reg3 β mit seinen pleiotropen Wirkungen in diese Pathologien eingreift. Zum einen wird Reg3 β in CED abhängig vom Schweregrad der Inflammation vermehrt exprimiert (Gironella, et al. 2005), und zum anderen weist es *in vitro* antiinflammatorische Eigenschaften auf, welche auf eine STAT3-abhängige Expression von SOCS3 und die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B zurückzuführen sind (Closa, et al. 2007; Folch-Puy, et al. 2006). Daneben besitzt Reg3 β regenerative Eigenschaften (Simon, et al. 2003; Marz-Weiss, et al. 2011; Okomoto, 1999), welche sich möglicherweise auch auf die mucosale Zellhomöostase durch Beeinflussung von Proliferation und Differenzierung intestinaler Epithelzellen auswirken (Moucadel, et al. 2001). Die Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF κ B, sowie die Befunde, dass Reg3 β *in vitro* antiapoptotische Wirkungen entfaltet (Malka et al, 2000; Ortiz et al. 1998), sprechen für dessen Einfluss auf die Tumorigenese gastrointestinaler Tumore (Motoo, et al. 1998; Rosty, et al. 2002). Im Colon finden sich sowohl im murinen CAC-Modell (Bollrath, et al. 2009), als auch beim humanen SCC Hinweise hierfür (Cao, et al. 2009). Es fehlt bisher allerdings ein Nachweis, inwiefern sich die überwiegend *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse über Reg3 β auch *in vivo* nachweisen lassen. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Wirkung von Reg3 β , insbesondere im Hinblick auf die akut-ulzerierende Colitis und das CAC in einer transgenen Mauslinie zu untersuchen. Die spezifische Überexpression von Reg3 β in intestinalen Epithelzellen (IEC= *intestinal epithelial cells*) soll in einer Grundcharakterisierung zunächst Aufschlüsse über dessen basale Funktionen im Hinblick auf die intestinale Zellhomöostase geben. Im Anschluss werden die o.g. pathologischen Szenarien mit Hilfe des DSS- bzw AOM/DSS-Modells simuliert. Hierbei soll die Übertragbarkeit der bisherigen Erkenntnisse über Reg3 β hinsichtlich Entzündung und Tumorigenese überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Mausmodelle

3.1.1 Transgenes Mausmodell

Um Reg3 β in Epithelzellen des gesamten Intestinums überexprimieren zu können, wurde als responsives Element der transgenen Sequenz der *Villin*-Promoter gewählt. *Villin* kodiert für ein Aktin-bindendes Protein und wird in Vertebraten natürlicherweise in intestinalen Stammzellen, sowie Epithelzellen des proximalen Nierentubulus exprimiert. Des Weiteren wurde die rekombinante *Villin-Reg3 β* -DNA an ihrem 5'-Ende um eine sogenannte FLAG-Sequenz erweitert. Diese kodiert für ein zusätzliches Octapeptid, welches als gesondertes Epitop im Immunoblot detektiert werden kann. Dadurch ist bei proteinbiochemischen Analysen die artifizielle von der endogenen *Reg3 β* -Expression unterscheidbar. Das rekombinante Genkonstrukt wurde unmittelbar nach Befruchtung der Oozyte durch pronukleäre Mikroinjektion injiziert.

3.1.2 Chemische Induktion einer akuten Colitis

Um eine akute Colitis zu induzieren, wurde den Versuchstieren zunächst am ersten Tag des Experimentes die karzinogene Substanz Azoxymethan (AOM 10 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Am Tag Fünf folgte eine fünftägige Applikation von 3 % bzw. 2,5 % Dextran Sodium Sulfat (DSS, MP Biomedicals) im Trinkwasser. Insgesamt wurden 3 Behandlungsgruppen jeweils am Tag 15 geopfert.

3.1.3 Chemische Induktion eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms

Die Induktion eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms (CAC) wurde ebenfalls mit der intraperitonealen Applikation von Azoxymethan (AOM 10 mg/kg Körpergewicht) am ersten Tag eingeleitet. Im Gegensatz zur Colitis-Gruppe durchliefen diese

Versuchstiere insgesamt 3 DSS-Zyklen, wobei die jeweilige DSS-Konzentration im Trinkwasser mit jedem Zyklus verringert wurde. Zusätzlich wurde 5 Tage vor dem zweiten DSS-Zyklus eine zweite Dosis AOM appliziert.

3.2 Genotypisierung

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient dazu, definierte Nucleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nucleinsäuren zu amplifizieren. Zu Beginn der in 3 Phasen ablaufenden Reaktion wird zunächst die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94 °C bis 96 °C denaturiert. An die entstehenden Einzelstränge können sich nun Primer innerhalb der entsprechenden Gensequenz komplementär anlagern. Dadurch bilden sich in der anschließenden Abkühlung auf 30 °C kurze, doppelsträngige Gensequenz-Primer-Hybride, wobei das 3'-Ende des Primers als Ausgangspunkt für die Elongation durch die thermostabile DNA-Polymerase dient. Nach Abschluss der Elongation wird durch erneutes Erhitzen bzw. Denaturieren der nächste Zyklus eingeleitet. Mit jedem Zyklus wird dabei die DNA-Menge verdoppelt, wodurch eine exponentielle Amplifikation der DNA-Ausgangsmenge erreicht wird. Die gesamte Reaktion wird in automatisierten Thermoblöcken durchgeführt.

Der einfache PCR Ansatz (20 µl) beinhaltet:

10x Puffer	(2 µl)
50 mM MgCl ₂	(0,8 µl)
100 mM dNTP TaqPolymerase (5 u/µl)	(0,4 µl)
DNA (20-100 ng)	(0,15 µl)
20 mM Primer Forward	(1 µl)
20 mM Primer Reverse	(1 µl)
H ₂ O	(13,65 µl)

3.2.2 Oligonucleotidsequenzen

Die verwendeten Primer wurden mit der Software PrimerExpress 1.0 designt. Mit Hilfe von PCR-Analyse wurden Primer Dimere und unspezifische Produkte ausgeschlossen.

CyclinA-F	GGCATTTCGGGTCGCG
CyclinA-R	ATTCTCTTGGTCTTCCTGATGCA
CyclinB-F	ACTTCAGCCTGGGTCGCC
CyclinB-R	ACGTCAACCTCTCCGACTTTAGA
CyclinD1-F	CCCTGACACCAATCTCCTCAAC
CyclinD1-R	GCATGGATGGCACAATCTCCT
CyclinE-F	ATGTGGCCGTGTTTTGCA
CyclinE-R	GGTCTGATTTCCGAGGCTGA
Cdk2-F	AGTCGGTTTGTCTGGGAC
Cdk2-R	CAGGGCTGCTTTGGCTGA
Cdk4-F	GCCTGTGGTGGTTACGCTCT
Cdk4-R	ACAGCCAACGCTCCACATG
C-myc-F	AACTACGCAGCGCCTCCC
C-myc-R	ATTTTCGGTTGTTGCTGATCTGT
Cryptdin-F	CAGCCAGGAGAAGAGGACCAG
Cryptdin-R	TAGCATACCAGATCTCTCAACGATTC
Cyclophilin-F	ATGGTCAACCCCACCGTGT
Cyclophilin-R	TTCTGCTGTCTTTGGAACCTTTGTC
ICAM-F	GCAGTCCGCTGTGCTTTGA
ICAM-R	CTCCGGAAACGAATACACGGT
IL-1 β -F	GTGGCTGTGGAGAAGCTGTG
IL-1 β -R	GAAGGTCCACGGGAAAGACAC
IL-6-F	ATGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
IL-6-R	GTATGAACAACGATGATGCACTTG
IL-10-F	GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA
IL-10-R	ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT
IL-11-F	CTG CAC AGA TGA GAG ACA AAT TCC

IL-11-R	GAAGCTGCAAAGATCCCAATG
IL-22-F	AGACGTTCTGCTCCCCCAGT
IL-22-R	GGTCAGGAAAGGCACCACC
KC-F	GCCAATGAGCTGCGCTGT
KC-R	CCTTCAAGCTCTGGATGTTCTTG
Lgr5-F	GAGGAAGCGCTACAGAATTTGAGA
Lgr5-R	GTGGCACGTAGCTGATGTGG
Muc2-F	TCGCCCAAGTCGACACTCA
Muc2-R	GCAAATAGCCATAGTACAGTTACACAGC
p21-F	ATTCAGAGCCACAGGCACCAT
p21-R	TCTCCGTGACGAAGTCAAAGTT
p27-F	CGAGGAGGAAGATGTGTCAAACGT
p27-R	TCCACCTCCTGCCATTTCGTAT
Reg3 β -F	CTCCTGCCTGATGCTCTTAT
Reg3 β -R	TTGTTACTCCACTCCCATCC
Sucrase-Isomaltase-F	CAACCTCGGCAAAACCTTTATAGT
Sucrase-Isomaltase-R	TGCAGCCTCTCTCTACGCAA
Synaptophysin-F	TTCGTGAAGGTGCTGCAGTG
Synaptophysin-R	TCTCCGGTGTAGCTGCCG
TNF α -F	ACTCCAGGCGGTGCCTATG
TNF α -R	GAGCGTGGTGGCCCCT

3.2.3 Histologie

Zur mikroskopisch-morphologischen Charakterisierung des Darms wurden Paraffinschnitte angefertigt. Dazu wurden das Kolon bzw. Jejunum direkt nach der Präparation longitudinal eröffnet und spannungsfrei um Holzspatel gewickelt, so dass die unterschiedlichen Abschnitte in Form einer Rolle übereinander zum Liegen kamen (sog. *Swiss role*). Die Fixierung erfolgte in 4 %-iger Paraformaldehydlösung für 12 Stunden bei 4 °C. Anschließend wurde das Gewebe dehydriert und in

flüssigem Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Mikrom HM355S) wurden 3 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt.

3.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient der morphologischen Untersuchung von feingeweblichen Schnitten. Sie setzt sich aus zwei verschiedenen Einzelfärbungen zusammen, welche eine unverfälschte Übersichtsdarstellung über Gewebsstrukturen ermöglicht. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin färbt basophile Strukturen der Zelle, v.a. den Zellkern mit darin enthaltener DNA und das raue Endoplasmatisches Reticulum blauviolett an. Eosin hingegen färbt vor allem Plasmaproteine, die sich durch ihre Azidophilie bzw. Eosinophilie auszeichnen, rot. Die auf einem Objektträger getrockneten Paraffinschnitte wurden zunächst für 10 Minuten in dem Intermedium Xylol deparaffinisiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 % und 50 %) in jeder Verdünnung jeweils 3 Minuten in ein wässriges Milieu überführt. Die Präparate wurden zuerst für 60 Sekunden in Hämatoxylin und anschließend für 20 Sekunden in 1 %-igem Eosin inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 96 % und 100 %) für jeweils 40 Sekunden. Nach Entfernung des Alkohols durch eine weitere 5-minütige Inkubation in Xylol wurden die Schnitte mit VectaMount Medium (Vector Laboratories) und einem Deckglas konserviert.

3.2.5 Alcianblau Färbung

Der kupferhaltige Farbstoff Alcianblau eignet sich aufgrund seiner kationischen Eigenschaft besonders zur Anfärbung von Mucopolysacchariden und Glucosaminoglykanen. Diese Makromoleküle sind zytoplasmatische Bestandteile in Becherzellen, welche mit einer großen Häufigkeit v.a. im Colonepithel vertreten sind. Das Zytoplasma dieses Zelltypus stellt sich nach Anfärbung mit Alcianblau, grünbläulich da. Entparaffinierung, Dehydrierung und Konservierung erfolgten nach selbigem Schema wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Die Präparate wurden für

jeweils 30 Minuten in Alcianblau inkubiert und anschließend die Zellkerne mit Nuclear fast red (Vector Laboratories) gegengefärbt.

3.3 Immunhistochemie (IHC)

3.3.1 Prinzip des indirekten Verfahrens

Mit der Immunhistochemie lassen sich gezielt zelluläre Antigene in einer Antigen-Antikörper-vermittelten Reaktion darstellen. Im sogenannten indirekten Verfahren wird dabei der gebundene Primärantikörper durch einen Sekundärantikörper detektiert, welcher im Falle der *Labelled-(Strept-)Avidin-Biotin-Methode* (LSAB) biotinmarkiert ist. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität von Biotin zu Avidin, kann ein ebenfalls biotinyliertes Enzym in Form eines Avidin-Biotin-Enzym-Konjugates an den Sekundärantikörper binden und sein entsprechendes Substrat umsetzen. Als Enzym wählt man hierbei die Meerrettich-Peroxidase, welche durch Zugabe des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) eine bräunliche Farbreaktion hervorruft.

3.3.2 Protokoll

Da im Zuge der Formalinfixierung Gewebsproteine miteinander vernetzt bzw. Antigene z.T. immobilisiert werden, müssen die Präparate nach der Deparaffinisierung und Überführung in Alkohol (siehe 3.2.1) zunächst demaskiert werden. Die Schnitte wurden zu diesem Zwecke für 20 Minuten in saurem Citratpuffer (Unmasking Solution, Vector Laboratories) in einer Mikrowelle bei 360 W gekocht und anschließend für weitere 20 Minuten abgekühlt. Nach zehn-minütiger Inkubation in 3 %-igem H₂O₂ wurden die Schnitte in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 5 Minuten gewaschen und 30 Minuten in einer Lösung bestehend aus 3 % Bovinem Serum Albumin (BSA, Sigma) in PBS und Streptavidin geblockt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper in einer 3 % BSA/PBS-Biotin-Lösung für acht Stunden bei 4 °C. Der speziespezifische, biotinylierte Zweitantikörper wurde nach Waschung der Präparate in PBS in einer 1:1000 Verdünnung in 3 % BSA/PBS für 30 Minuten zu den Schnitten gegeben. Das Avidin-Biotin-Enzymkonjugat (ABC Kit, Vector Laboratories) wurde für weitere 30

Minuten aufgetragen und anschließend das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB Substrate Kit, Vector Laboratories) hinzugefügt. Nach Beobachten des Farbumschlages wurden die Nuclei mit Hämatoxylin gegengefärbt.

3.3.3 Verwendete Antikörper (IHC)

Primäre Antikörper

Antigen	Verdünnung	Medium	Firma	Katalognummer
BrdU	1:400	3 % BSA/PBS+ Biotin	Amersham Bioscience	RPN201
phosphoryliertes Histon H3	1:100	3 % BSA/PBS+ Biotin	Cell Signalling	#9701
cleaved Caspase 3	1:1000	3 % BSA/PBS+ Biotin	Cell Signalling	#9661S
Lysozym	1:100	3 % BSA/PBS+ Biotin	DAKO Cytomation	A0099

Sekundäre Antikörper:

	Verdünnung	Medium	Firma	Katalognummer
Anti-rabbit	1:1000	3 % BSA/PBS	Vector Laboratories	BA-1000
Anti-rat	1:1000	3 % BSA/PBS	Vector Laboratories	BA-9400

Anti-sheep	1:1000	3 % BSA/PBS	Vector Laboratories	BA-6000
------------	--------	-------------	------------------------	---------

3.3.4 Histologische Kriterien für die Grundcharakterisierung

Für die histologische Grundcharakterisierung wurden entsprechende Färbungen von Colon und Jejunum von 8 bis 9 Wochen alten transgenen Mäusen hinsichtlich morphologischer Kriterien mit alterskorrelierten Wildtypen verglichen. Das Jejunum wurde hierbei als Repräsentant des Dünndarms gewählt, um die Anzahl der Präparate überschaubar zu halten.

In H&E-Färbungen wurde die Länge jejunaler Villi bzw. die Tiefe der Colonkrypten in einer 20-fachen Vergrößerung ausgemessen (Axiocam und Software von Axiovision). Hierbei wurden im proximalen, mittleren und distalen Abschnitt jeweils 7 Villi bzw. Krypten berücksichtigt.

Um eventuelle Unterschiede in der Stammzellproliferation festzustellen, wurde den Versuchstieren 90 Minuten vor ihrer Opferrung das Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU, Sigma) in einer Dosierung von 75 µg/g ^{Körpergewicht} intraperitoneal injiziert. BrdU kann nach Aufnahme in die Zelle in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat während der S-Phase des Zellzyklus in die neu-synthetisierte DNA eingebaut werden. In immunhistochemisch gegen BrdU gefärbten Präparaten wurden die entsprechend BrdU-positive Zellen in jeweils 28 Krypten von Jejunum bzw. Colon ausgezählt. Da mit BrdU ausschließlich die S-Phase detektiert werden kann, wurde zusätzlich eine Färbung gegen phosphoryliertes Histon H3, einem Marker der M-Phase, angefertigt und analog zur BrdU-Auszählung ausgewertet.

3.3.5

3.3.6 Histologische Scores zur Auswertung des Gewebeschadens

3.3.6.1 Epithelialer Schaden

- 0 - Normal
- 1 - epitheliale Hyperproliferation
- 2 - Verlust der Krypte <50 %
- 3 - Verlust der Krypte 50-90 %
- 4 - Kompletter Verlust der Krypte, Oberflächenepithel intakt
- 5 - Ulcus

3.3.6.2 Infiltration von Immun- und Entzündungszellen

Mucosa	Submucosa	Muscularis/Serosa
0 - keine	0 - keine	0 - keine
1 - mild	1 - moderat	2 - moderat bis schwer
2 - moderat	2 - schwer	
3 - starke		

3.3.6.3 Berechnung des Gesamtscores

Die oben genannten Kriterien wurden für die zwei am stärksten betroffenen Darmabschnitte pro Tier angewandt. Die Werte für epithelialen Schaden und Immunzellinfiltration wurden jeweils addiert. Die Werte der beiden betroffenen Areale (0-12) wurden anschließend gemittelt.

3.3.7 Histologische Auswertung der Tumorentwicklung

Von den entsprechenden Colon-Gewebsblöcken wurden Serienschritte angefertigt. Dabei wurden im Abstand von 200 µm zwischen den Serien jeweils ca. sieben Schnitte à 3 µm Dicke entnommen.

3.3.7.1 Ermittlung der Tumorzahl und -größe

Die tumorösen Areale wurden in H&E-Färbungen der einzelnen Serien entlang der Schnittachse hinsichtlich ihrer flächenhaften Progression beurteilt. Intakte Epithelien bzw. Colitis-Areale wurden als Begrenzung zwischen den einzelnen Tumoren angesehen. Der jeweils größte Querschnitt eines Tumors wurde als repräsentative Tumorfläche festgehalten. Die Einteilung der Gesamtheit aller Tumore erfolgte der Größe nach 3 Kategorien:

Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3 (Mikrotumore)
> 3 mm ²	1-3 mm ²	<1 mm ²

Die relativen Tumorinzidenzen der jeweiligen Kategorie wurden graphisch nach Genotyp sortiert aufgetragen.

3.3.7.2 Beurteilung des Proliferations- bzw. Apoptoseverhaltens in Colon-Karzinomen

Von jedem Genotyp wurden jeweils 5 Tumore aus der Kategorie mit der höchsten Tumorinzidenz verblindet ausgewählt. Von den in etwa gleich großen Tumoren wurden in einer 20x-Vergrößerung 4 Bilder aufgenommen, welche zusammen einer

Fläche von 0,356 mm² entsprechen. Um das Proliferationsverhalten zu ermitteln, wurden die entsprechenden Tumorareale immunhistochemisch gegen BrdU und phosphoryliertes Histon H3 gefärbt. Den Versuchstieren wurde dementsprechend 90 Minuten vor der Opferrung BrdU intraperitoneal injiziert (siehe 3.3.4). Für die Bestimmung des Apoptoseverhaltens wurde als Marker in der Immunhistochemie ein Primärantikörper gegen cleaved Caspase 3 verwendet. Die Auszählung der entsprechend positiven Zellen wurde nach Genotyp sortiert graphisch aufgetragen.

3.4 Protein und DNA Analyse

3.4.1 Isolierung von Gesamtgewebe

Die für die Isolierung relevanten Gewebe wurden den Tieren nach Betäubung mit Isofluran und anschließender Tötung durch atlanto-occipitale Dislokation entnommen. Die entsprechenden Darmabschnitte wurden nach deren Präparation zunächst mit kühlem PBS gespült und longitudinal eröffnet. Zur Isolierung von Gesamtmucosa wurde ein circa 2 x 2 mm großes Stück reseziert und sofort in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Isolierung von intestinalen Epithelzellen

Um intestinale Epithelzellen aus Gesamtmucosagewebe zu isolieren, wurden ca. 2-3 mm breite Darmfragmente reseziert und anschließend in einem 50 ml Falcon mit 10 ml HBSS 30 mM EDTA-Lösung auf einem Schüttler bei 100 rpm und 37 °C für 8 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit gevortext und 3 Minuten auf Eis gestellt. Das Ca²⁺-bindende EDTA interferiert dabei mit Zell-Zell-Kontakten, wodurch es zur Ablösung der Epithelzellen von der Lamina propria kommt. Die sich nun in Lösung befindlichen Epithelzellen wurden in ein neues Falcon überführt und bei 4 °C und 1700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Epithelzellpellet mit

2,5 ml, 4 °C kaltem PBS gewaschen und zu je 800 µl in Eppendorf-*Tubes* transferiert. Diese wurden bei 4 °C und 5000 rpm für weitere 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Epithelzellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

3.5 RNA-Isolierung und Analyse

3.5.1 RNA-Extraktion aus Geweben bzw. Zellen

Für die Isolierung von RNA aus Gesamtmucosa und Epithelzellen wurde ein kommerzielles Kit-System (RNeasy-Kit, Qiagen) verwendet. Das Prinzip beruht auf der Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran, welche in eine Plastiksäule integriert ist. Durch mehrmaliges Waschen der Membran wird die gebundene RNA aufgereinigt und in einem letzten Schritt mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die Isolierung erfolgte anhand des Protokolls des Herstellers bei Raumtemperatur:

Die tiefgefrorenen Epithelzellpellets bzw. Gesamtmucosabiopsien wurden zunächst mit 1 %-igem β -Mercaptoethanol versetzten RLT-Puffer (350 µl) lysiert. Gesamtmucosa-Proben wurden hierzu mit einem auf dem Rotator-Stator-System-basierendem Homogenisator dispergiert. Die Homogenisatorsonde wurde nach jeder Dispergierung in 20 % Natriumdodecylsulfat(SDS)-haltiges, RNase-freies Diethylpyrocarbonat(DEPC)-Wasser (autoklaviert) eingetaucht und anschließend zwei Mal mit reinem DEPC-Wasser gespült. Epithelzellpellets wurden mit einer Pipette mehrmals resuspendiert und im Anschluss in eine Qiagen-Shredder-Säule überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Vom Zentrifugat der lysierten Gesamtmucosaproben wurde der Überstand in ein neues Tube überführt. Von den lysierten Epithelzellen wurde das gesamte Zentrifugat, welches durch die Shredder-Membran von unerwünschten Zellbestandteilen getrennt wurde, verwendet. Dem Überstand bzw. Zentrifugat wurden 350 µl 70 % Ethanol beigemischt. Die homogene Lösung wurde darauf in eine Qiagen RNeasy-Säule transferiert und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgt der erste Waschschrift mit 700 µl RWI Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 Sekunden. Der Überstand wurde verworfen und es folgten zwei weitere

Waschschritte mit jeweils 500 µl RPE-Waschpuffer. Die Zentrifugation erfolgte zwischen den Waschschritten wie zuvor bei 10.000 rpm für 15 Sekunden bei RT. Nach Abschluss des Waschvorgangs wurde die Membran der Qiagen Säule durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm getrocknet. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser auf die Säulenmembran und anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm für eine Minute. Die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe wurde mit Hilfe eines Spectrophotometers (Nanodrop™) gemessen. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.5.2 Realtime Reverse Transcriptase PCR (RT)-PCR

Mit Hilfe der Real-Time-PCR ist es möglich, die Expression von bestimmten Genen auf mRNA-Ebene quantitativ zu erfassen. Die Analyse der entsprechenden RNA-Proben erfolgt dabei durch sukzessive Anwendung zweiter Methoden.

3.5.3 cDNA-Synthese

Da in der PCR für die Genamplifikation DNA-spezifische Polymerasen eingesetzt werden, muss die RNA zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase in die komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA-Synthese erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers der reversen Transkriptase (Invitrogen™). Dabei wurden zunächst 1 µg RNA, 1 µl 40 µM Oligo(dT)-Primer und 1 µl 100 mM dNTP durch Zugabe einer entsprechenden Menge H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 13 µl gebracht und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach 5-minütiger Abkühlung und kurzer Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit, wurde durch Zugabe von 4 µl SSRT 5x Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase-Out 40 U/µl und 1 µl des Enzyms SSRT 200 U/µl der Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die darauffolgende Transkription erfolgte für eine Stunde bei 50 °C. Durch abschließende Zugabe von 60 µl H₂O wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:4 verdünnt und anschließend bei -20 °C bis zur Wiederverwendung gelagert.

3.5.4 RT-PCR

Um die Amplifikation der cDNA quantitativ zu detektieren, greift man in der RT-PCR-Methode u.a. auf den Cyanin-Farbstoff *SYBR® Green* zurück. Dieser fluoreszierende Farbstoff bildet durch Interkalation in doppelsträngige DNA einen DNA-Farbstoff-Komplex, welcher blaues Licht ($\lambda_{\max}=494\text{ nm}$) absorbiert und energieärmeres, grünes Licht ($\lambda_{\max}=521\text{ nm}$) emittiert. Die gemessene Emission folgt mit fortschreitenden Zyklen einem sigmoidalen Kurvenverlauf, wobei der Beginn des Abschnitts mit exponentiellem Wachstum durch den sogenannten *cycle threshold* (C_t -Wert) beschrieben wird, welcher eine signifikante Signalzunahme über das Hintergrundrauschen hinaus markiert. Je höher der anfängliche cDNA-Gehalt eines exprimierten Gens ist, desto früher wird sein entsprechender C_t -Wert erreicht. Die Größe des C_t -Wertes verhält sich somit indirekt proportional zum cDNA-Gehalt.

3.5.5 Delta- C_t -Methode

Zur Ermittlung der quantitativen Expression des gesuchten Gens wird dessen C_t -Wert in Relation zu einem nicht-regulierten, konstant exprimierten Referenzgen (*housekeeping gene*) gesetzt. Dieser relative Unterschied drückt sich in der Differenz $\Delta C_t = C_{t(\text{Referenzgen})} - C_{t(\text{Gen})}$ aus. Da mit jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wird, setzt man den Wert ΔC_t als Exponent zur Basis 2 ein. Von den so errechneten $2^{\Delta C_t}$ -Werten wurden für den jeweiligen Geno- und Behandlungstyp Mittelwert und Standardabweichung errechnet und im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe graphisch dargestellt. Als Referenzgen wurde *Cyclophilin* gewählt.

3.5.6 Oligonukleotidsequenzen

Für die einzelnen Sequenzen siehe Punkt 3.2.2.

3.6 Agarose Gelelektrophorese der RNA

Zum Nachweis möglicher RNA-Denaturierung wurden die jeweiligen Samples mittels Elektrophorese im Agarosegel nach Größe aufgetrennt. Die Gelkammer und sämtliches Zubehör wurden vor der Benutzung mit 3 %-igem H₂O₂ gereinigt. Das Gel setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Diethylpyrocarbonat(DEPC)-Wasser	85 ml
Agarose	1,5 g
Tris(hydroxymethyl)aminoethan(TAE)-Puffer	10 ml
Formaldehyd	5 ml

Das DEPC-Wasser wurde mit der entsprechenden Menge Agarose vermischt und aufgekocht. Während der Abkühlung wurden der TAE-Puffer, sowie das Formaldehyd hinzugefügt und das Gemisch in die Gelkammer gegossen. Nach Aushärtung wurde die Kammer mit 500 ml MOPS aufgefüllt und der Größenmarker, sowie die jeweiligen Proben aufgetragen. Von jeder Probe wurden zwischen 20 µg RNA in 10 µl DEPC-Wasser gelöst und mit 10 µl eines RNA-Auftragpuffers vermischt, welcher sich wie folgt zusammensetzt:

MOPS 10 %	160 µl
Bromphenolblau	80 µl
Formamid	720 µl
Formaldehyd 37 %	720 µl
Glycerol	160 µl
DEPC Wasser	120 µl

Das Gemisch aus RNA-Probe und -Laufpuffer wurde bei 75 °C aufgekocht und anschließend 1 µl Ethidiumbromid in einer Verdünnung von 1:20 hinzugefügt. Die so aufbereiteten Proben (Endkonzentration der RNA= 0,5 µg/µl) wurden in die einzelnen Wells gegeben und bei niedriger Spannung (<60 mV) aufgetrennt. Das

Auftreten von zwei deutlich erkennbaren Banden bei 18 S und 28 S sprechen hierbei für eine adäquate Qualität des RNA-Isolats.

3.7 Proteinbiochemie

3.7.1 Proteinextraktion aus Epithelzellen und Gesamtmucosa

Die tiefgefrorenen Epithelzellpellets bzw. Gesamtmucosabiopsien wurden nach Zugabe von 30-70 µl Proteinlysepuffer mit Hilfe eines Stößels lysiert, für ca. 5 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Tube transferiert. Der verwendete Lysepuffer setzt sich wie folgt zusammen:

Lysepuffer Stock: 50 mM Tris HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 3 mM EDTA; 3 mM EGTA; 1 % Triton; 0,5 % NP40; 10 % Glycerol; 25 mM Natrium Pyrophosphat

plus eine Tablette Protease-Inhibitoren (Roche) auf 50 ml Lysepuffer (Inhibition gegen Chymotrypsin, Pankreas Extract, Papain, Pronase, Thermolysin, Trypsin)

plus Phosphatase Inhibitor für 10 ml Lysepuffer. Von diesem Gemisch (Lysepuffer inklusive Protease-/Phosphatase-Inhibitoren) wurden für jede einzelne Probe jeweils 8,2 ml verwendet; Hierzu wurden weiterhin hinzugefügt: 10 µl 1 M DTT; 500 µl 1 M β-Glycerolphosphat; 500 µl 500 mM NaF; 200µl 100 mM Na PMSF; 500 µl 100 mM Na Orthovanadat.

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach Bradford. Der verwendete Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G250* bildet in saurer Lösung Komplexe mit Proteinseitenketten und wird dabei in seiner unprotonierten Form stabilisiert, wodurch sich das Absorptionsmaximum von rot (595 nm) nach blau (465 nm) verschiebt und sich der Extinktionskoeffizient gegenüber der unkomplexierten Form stark erhöht. Die bei 595 nm gemessene Absorption korreliert

in einem eingeschränkten Messbereich mit der Proteinkonzentration, wobei der Test insgesamt nicht-linear verläuft. Mittels einer zuvor erstellten Eichgerade mit bekannten Albumin-Konzentrationen kann die Proteinmenge im Testansatz bestimmt werden. Dabei wurden jeweils 1 µl der zu bestimmenden Probe zu 1 ml 1:6 verdünnter Bradford-Lösung (Biorad) hinzugegeben.

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Analyse von Proteinen mittels Trennung von Proteingemischen im elektischen Feld. Als Trennmedium dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Da das Migrationsverhalten der Proteine nach Anlegung einer Gleichspannung ausschließlich von der Molmasse abhängig sein soll, wird den Proben das anionische Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) im Überschuss hinzugefügt, wodurch die Proteine eine konstant negative Ladung aufweisen. Hierfür wurde anhand der zuvor bestimmten Proteinkonzentration von jeder Probe die gleiche Menge an Protein (15-35 µg) entnommen und mit 5x-Laemmli-Puffer incl. 5 % β-Mercaptoethanol versetzt. Die Menge an 5x-Laemmli-Puffer wurde so gewählt, dass dieser im Endvolumen der Probe in einem 1:5-Verhältnis vorlag.

Laemmli-Puffer: 3,55 ml H₂O dest; 1,25 ml Tris HCl 0,5 M pH 6,8; 2,5 ml Glycerol; 2 ml 10 % SDS; 0,2 ml Bromphenol Blau

plus β-Mercaptoethanol (Endkonzentration 5 %)

Die Proteine wurden anschließend für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und dadurch denaturiert. Sammel- bzw. Trenngel wurden zwischen zwei, im Abstand von 1,5 mm in eine Einspannvorrichtung geklemmten Glasplatten gegossen. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtete sich dabei nach der molekularen Größe des zu detektierenden Proteins.

Zusammensetzung des Trenngels:

Konzentration des Gels	Acrylamid-Bisacrylamid (40 %) in ml	Laufgelpuffer in ml	Destilliertes H ₂ O in ml	TEMED in μ l	10 % APS in μ l
8 %	2	2.5	5.5	7.5	50
10 %	2.5	2.5	5	7.5	50
12 %	3	2.5	4.5	7.5	50
15 %	3.75	2.5	3.75	7.5	50

Zusammensetzung des Sammelgels:

Acrylamid-Bisacrylamid (40 %)	Sammelgelpuffer	Destilliertes H ₂ O	TEMED	10 % APS
713 μ l	950 μ l	4,6 ml	15 μ l	62,5 μ l

Die Vernetzung der Acrylamid-Monomere zu einem stabilen Polymernetz wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat und Tetramethylethyldiamin erreicht.

Die fertige Gel wurde in eine mit 1x-Laufpuffer gefüllten Kammer vertikal aufgestellt und die im Sammelgel befindlichen Taschen (Wells) mit den gekochten Proben beladen. Ein spezielles Gemisch aus farblich markierten Proteinen mit definiertem Molekulargewicht (Precision Plus Protein Standard All Blue, BioRad) wurde als Standard aufgetragen. Nach Anlegung einer Gleichspannung von 80 V wurde zunächst die Konzentration der Proteine im Sammelgel abgewartet. Anschließend wurde die Spannung solange auf 100-120 V erhöht, bis die Proteinbanden bis zum unteren Pol der Gel-Matrix durchgelaufen waren (Dauer etwa 90 Minuten). Im direkten Anschluss erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine zuvor in Methanol aktivierten Polyvinylendifluorid(PVDF)- Membran (Immobilon TM

Transfer Membran; Millipore). Dabei wurde das Acrylamidgel einerseits von Membran, Filterpapier und Zelluloseschwamm und andererseits ausschließlich von Filterpapier und Zelluloseschwamm bedeckt und das so entstandene *sandwich* durch Überrollung mit einem 15 ml-Tube weitestgehend von Luftblasen befreit. Damit die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen werden konnten, wurde die Anordnung in eine Halterung eingespannt, deren Kathodenseite zum Gel und deren Anodenseite zur Membran ausgerichtet war. Bei einer Stromstärke von 400 mA erfolgte der Transfer für 60 Minuten bei 4°C in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer. Alle Komponenten der SDS-Gelelektrophorese- bzw. Transfer-Apparatur, wie Kammer, Halterung, Elektrodenabdeckung und Transformator wurden von der Firma Biorad benutzt.

Verwendete Puffer:

10x-Laufpuffer: 30,3 g Tris; 144,1 g Glycin; 10 g SDS in 1000 ml H₂O

10x-Transferpuffer: 14,5 g Tris (12 mM); 72 g Glycin (96 mM) in 1000 ml H₂O

1x-Transferpuffer: 100 ml 10xTransferpuffer; 200 ml Methanol; 700 ml H₂O

3.7.4

3.7.5 Immunoblotanalyse

Die Membran wurde nach dem Transfer in 3 % Magermilch in 0,1 % PBS Tween für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Der primäre Antikörper wurde dabei entweder in 3 % Magermilch oder 3 % Rinderserumalbumin (BSA) in 0,1 % PBS Tween entsprechend der Herstellerangaben verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 Mal mit jeweils frischem 0,1 % PBS Tween gewaschen. Danach wurde der sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper in einer Verdünnung von 1:3000- 1:5000 in 3 % Magermilch in 0,1 % PBS Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur zur Membran hinzugegeben. Nach erneutem, dreimaligem Waschen in 0,1 % PBS Tween wurde circa 1 ml Peroxidasesubstrat (0,5 ml Lösung A plus 0,5 ml Lösung B, SuperSignal ECL Detektionskit, Pierce) zur Erkennung gebundener Sekundärantikörper für 5 Minuten auf die Membran gegeben. Durch die ablaufende Oxidation des Substrats entsteht eine Chemolumineszenz, welche mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

3.7.6 Verwendete Antikörper (Immunoblot)

Primärantikörper:

β-actin	1:3000	3 % Magermilch	Sigma	#A4700
COX2	1:400	3 % Magermilch	Sigma	#160106
Cyclin A	1:500	3 % BSA	Santa Cruz	SC751
Cyclin B1	1:500	3 % BSA	Santa Cruz	SC752
Cyclin D1	1:100	3 % BSA	Santa Cruz	SC718

Material und Methoden

iNOS	1:1000	3 % BSA	Santa Cruz	SC650
Reg3 β	1:250	3 % Magermilch	R&D Systems	MAB 5110

Sekundärantikörper:

anti-mouse	1:5000	3 % Magermilch	GE Healthcare	NA9310
anti-rabbit	1:5000	3 % Magermilch	NA9340-1ML	NA9340
anit-rat	1:2000	3 % Magermilch	GE Healthcare	NA9350

4 Ergebnisse

4.1 Bestätigung der transgenen Überexpression von Reg3 β in Jejunum und Colon

Um die mucosale Überexpression von Reg3 β nachzuweisen, wurden verschiedene Nachkommen einer Founderlinie analysiert. Es wurden zunächst intestinale Epithelzellisolate von Colon und Jejunum proteinbiochemisch untersucht. Das Jejunum wurde aus Übersichtsgründen als einziger Repräsentant des Dünndarms ausgesucht, Duodenum und Ileum wurden nicht berücksichtigt. Die Analyse im Westernblot zeigte gegenüber FvB-Kontrollen eine deutlich stärkere Expression von Reg3 β in Tg(Vil-Reg3 β)-Mäusen (Abb. 4). Die Analyse von aus Jejunum und Colon isolierter RNA zeigte im transgenen Modell tendenziell, aber nicht signifikant höhere mRNA-Level für Reg3 β . Die Qualität der RNA-Extrakte wurde durch Auftragung der Proben auf ein MOPS-gepuffertes Denaturierungsgel mit anschließender Elektrophorese überprüft. Hierbei zeigten sich deutlich ausgeprägte Banden im Bereich 18 S und 28 S, wodurch eine RNA-Denaturierung als mögliche Ursache für die relativ hohe Standardabweichung in der Gruppe der transgenen Tiere ausgeschlossen werden konnte. Interessanterweise fiel eine im Vergleich zum Colon wesentlich höhere Reg3 β -Expression im Jejunum auf, was dadurch erklärt werden kann, dass die Transkription der integrierten Reg3 β -Sequenz von der Villin-Aktivität abhängt, welche im Dünndarm allgemein höher ist als im Colon. Zusammengefasst wurde durch diese Befunde die transgene Überexpression in der verwendeten Mauslinie als bestätigt angesehen.

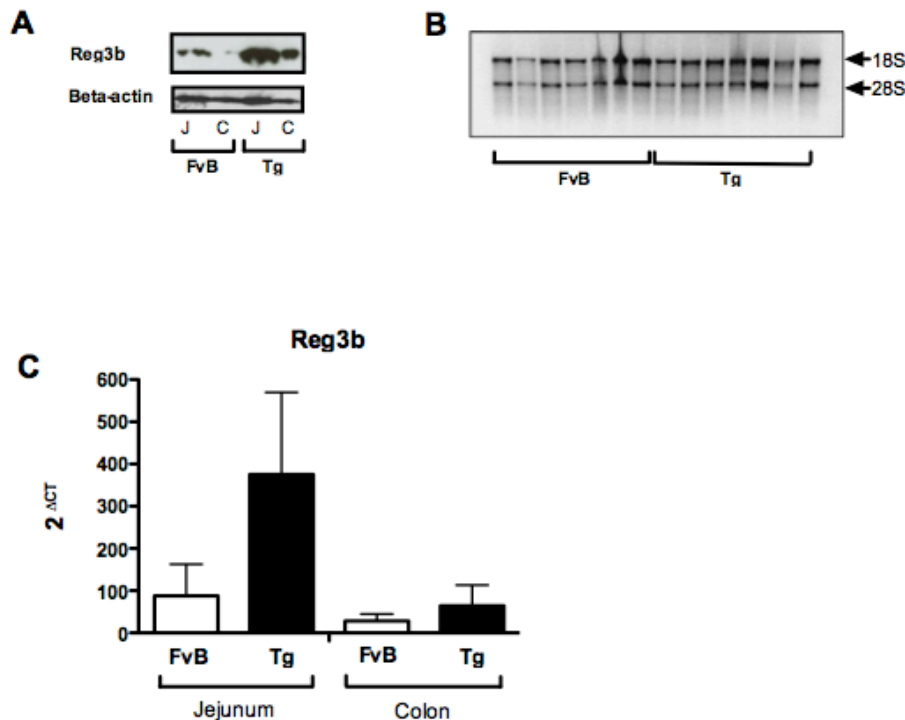


Abb. 4 Nachweis der transgenen Reg3β-Überexpression in Dünn- und Dickdarm

(A) Immunoblotanalyse von Reg3β aus Proteinisolaten aus intestinalen Epithelzellen; (B) RNA-Gelelektrophorese zum Ausschluss einer extraktionsbedingten Degradation. Die 18 S- bzw. 28 S-Banden sind deutlich zu erkennen, was für eine gute Qualität der RNA-Extrakte spricht (C) relative mRNA-Level von Reg3β in Jejunum und Colon. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt; FvB= Kontrollen, Tg= Tg(Vil-Reg3β)

4.2 Die Überexpression von Reg3β zeigt keinen Einfluss auf die intestinale Stammzellendifferenzierung und histologische Morphologie in Colon und Jejunum

Das intestinale Epithel ist ein komplex regulierter Zellverbund. Die im basalen Abschnitt der Lieberkühn-Krypten lokalisierten Stammzellen differenzieren sich im Dünn- und Dickdarm in drei funktionelle Zelltypen: die mehrheitlich vorkommenden resorptiv aktiven Enterozyten, mucus-sezernierende Becherzellen und enteroendokrine Zellen. Im Dünndarm existieren zusätzlich zwei weitere Sorten immunologisch wirksamer Zelltypen: die mit Peyer-Plaques assoziierten M-Zellen und die Nischen-bildenden Paneth-Körnerzellen. Bisher wurde eine regenerative Funktion für Reg3β in unterschiedlichen Geweben bereits beschrieben (Okomoto 1999; Simon, et al. 2003; Marz-Weiss, et al. 2011). *In vitro* stimuliert Reg3β zudem

das Wachstum intestinaler Epithelzellen (Moucadel, et al. 2001). Im Bezug auf die Grundcharakterisierung war deshalb eine zentrale Fragestellung, inwieweit sich die transgene Überexpression durch eine quantitative und möglicherweise auch qualitative Beeinflussung der Stammzellendifferenzierung auf die intestinale Zellhomöostase auswirkt

Zunächst wurden histologische Übersichtsfärbungen von Jejunum und Colon 8 bis 9 Wochen alter, transgener Mäuse angefertigt und im Vergleich zu alterskorrelierten Wildtypen auf morphologische Unterschiede hin beurteilt.

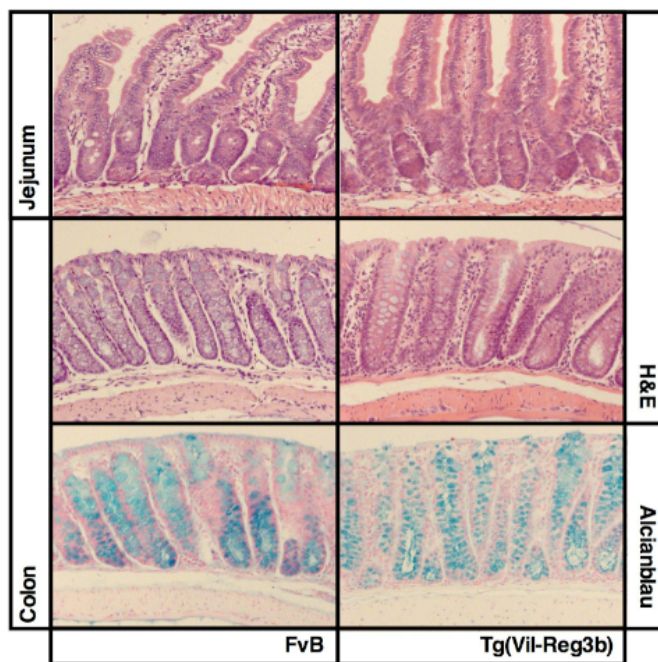


Abb. 5 Histologische Darstellung von repräsentativen Abschnitten in Jejunum und Colon

Dargestellt sind histologische Schnittbilder aus Jejunum und Colon. Die Übersichtsfärbungen wurden mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) angefertigt. Die Sonderfärbung mit Alcianblau diente der Darstellung von Becherzellen im Colon; FvB= Kontrollen

In der H&E-, sowie Alcianblau-Färbung konnte im transgenen Modell zunächst keine augenmerkliche Abweichung vom histologischen Erscheinungsbild entsprechender Kontrollgruppen erkannt werden. Für die objektive Auswertung wurden Villuslängen im Jejunum bzw. Kryptentiefen im Colon von distal nach proximal in drei ausgewählten Abschnitten vermessen. Dabei ergaben die Messwerte keinen

signifikanten Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen und unterstreichen damit den initialen Eindruck in der histologischen Betrachtung.

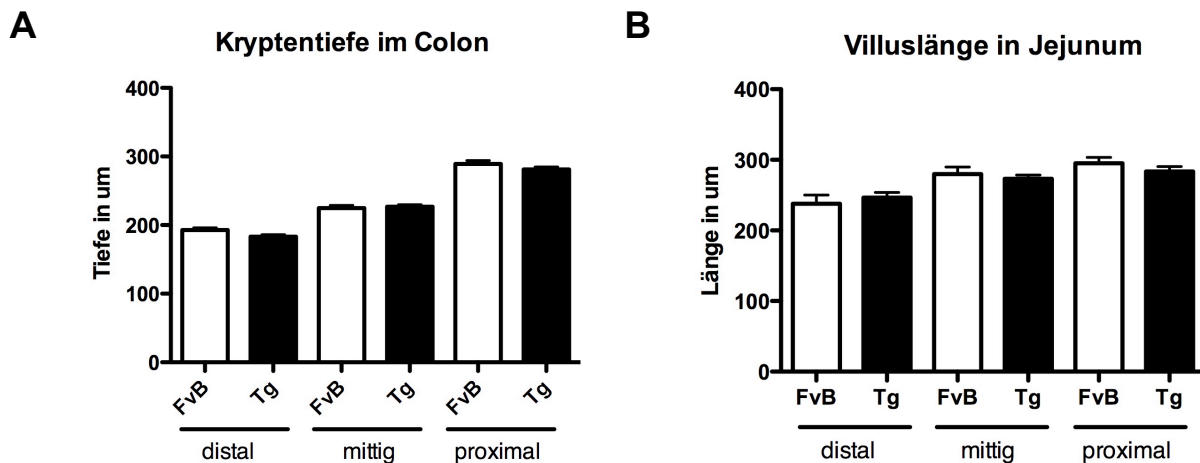


Abb. 6 Messdaten der histologischen Grundcharakterisierung

Darstellung der durchschnittlichen Kryptentiefe im Colon (A) bzw. Villuslänge im Jejunum (B). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt; FvB= Kontrollgruppe, Tg= Tg(Vil-Reg3 β)

Um beurteilen zu können, welchen Einfluss Reg3 β auf die Differenzierung der intestinalen Stammzelle ausübt, wurden RNA-Isolate aus Gesamtmucosabiopsien entsprechender Darmabschnitte hinsichtlich der Expression zelllinienspezifischer Gene untersucht. Für die einzelnen Zelllinien wurden folgende etablierte Marker verwendet:

Lgr5 → intestinale Stammzelle

Sucrase-Isomaltase → Enterozyt

Muc2 → Becherzelle

Cryptdin → Paneth-Körnerzelle

Synaptophysin → Enteroendokrine Zelle

Hierbei zeigte die RT-PCR-Analyse in transgenen Mäusen keine signifikant abweichenden mRNA-Level für die einzelnen Zelllinienmarker (Abb. 7). Zusätzlich zur RT-PCR-Analyse von *Lgr5* wurden die jejunalen Stammzellen in einer *in-situ-*

Hybridisierung gegen Olfactomedin 4 histologisch dargestellt. Hier ergab sich in Übereinstimmung mit dem Befund der mRNA-Analyse ebenfalls keine auffällige Abweichung in Tg(Vil-Reg3 β)-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen.

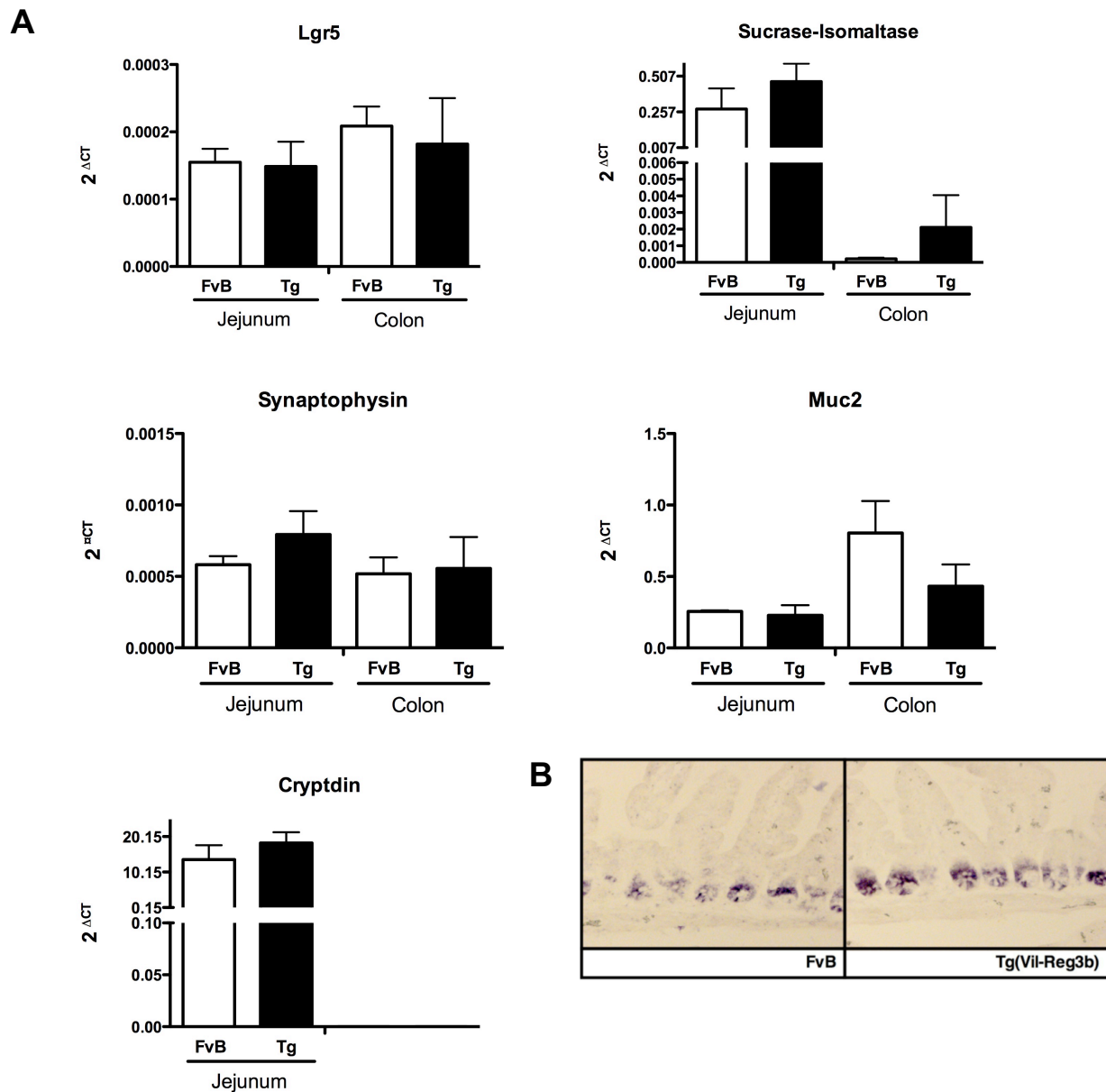


Abb. 7 Analyse verschiedener Zelllinienmarker zur Beurteilung der Stammzellendifferenzierung in Colon und Jejunum

(A) Die Graphen zeigen die semi-quantitative mRNA-Analyse von transgenen Tieren (Tg= Tg(Vil-Reg3 β)) und Wildtypen (FvB); (B) In-situ-Hybridisierung gegen den Stammzellmarker Olfactomedin 4 in jejunalen Abschnitten; Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt

Diese Ergebnisse zeigten insgesamt somit keine Beeinflussung der qualitativen Differenzierung intestinaler Stammzellen durch Reg3 β . Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit sich die transgene Überexpression von Reg3 β qualitativ auf die Stammzellvermehrung auswirkt. Hierzu wurde zunächst eine direkte Darstellung und Auszählung proliferierender Stammzellen vorgenommen. Eine Möglichkeit, die sich in der S-Phase befindenden Zellen in den Krypten detektieren zu können, besteht in der Applikation des Thymidinanalogons BrdU, welches ausschließlich in der S-Phase in DNA inkorporiert wird und in Gewebeparaffinschnitten immunhistochemisch dargestellt werden kann. Allen Versuchstieren wurde deshalb 90 Minuten vor ihrer Operation BrdU intraperitoneal injiziert, um hernach durch Auszählung entsprechend positiver Zellen einen Vergleich hinsichtlich der proliferativen Aktivität zwischen transgenem Modell und Wildtypen ziehen zu können.

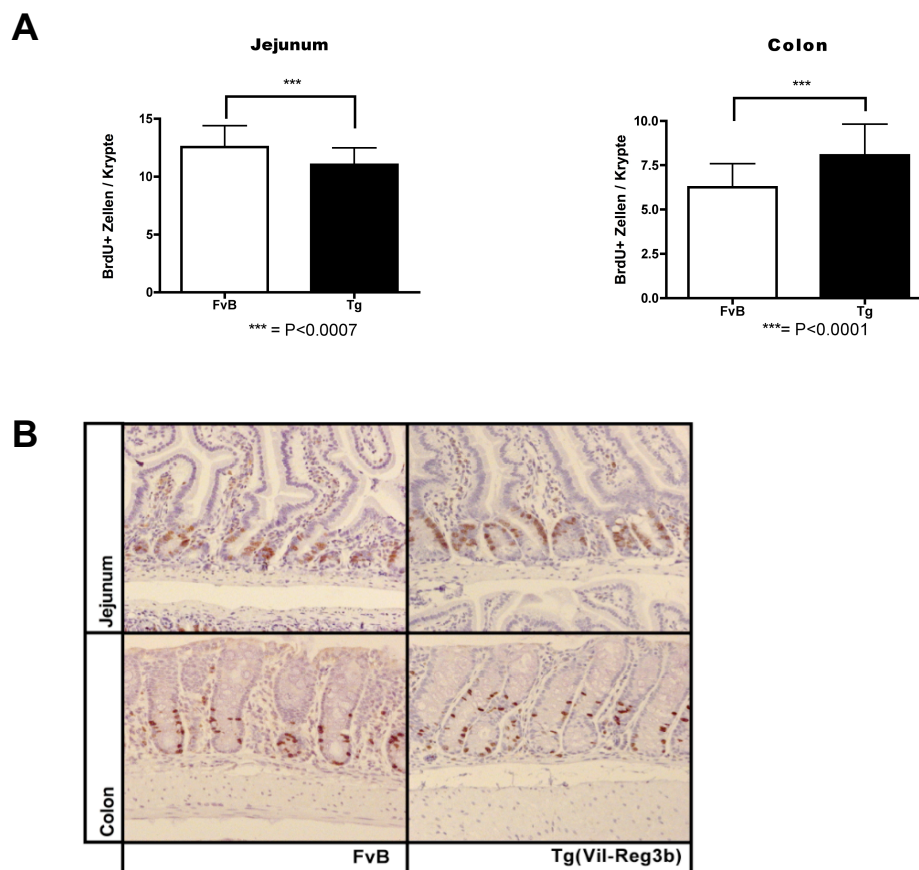


Abb. 8 Darstellung und Auswertung BrdU-positiver Zellen in Jejunum und Colon

(B) Immunhistochemische Färbung gegen BrdU in Jejunum und Colon mit (A) anschließender Auszählung entsprechend positiver Zellen und graphischer Darstellung der Auswertung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt FvB= Kontrollen, Tg= Tg(Vil-Reg3 β)

Die Auszählung zeigte dabei zwischen beiden Genotypen einen signifikanten, aber numerisch nur minimalen Unterschied. Obwohl die Villin-abhängige Expression von Reg3 β im Jejunum gegenüber dem Colon stärker sein müsste, wurde überraschenderweise dort eine verminderte Proliferation von Stammzellen in transgenen Tieren registriert. Im Colon transgener Tiere hingegen wurden mehr BrdU-positive Zellen festgestellt. Die in der Literatur in Zellkulturversuchen beschriebene Wirkung von Reg3 β auf die Proliferation intestinaler Stammzellen (Moucadel, et al. 2001) konnte somit in dieser Mauslinie nur im Dickdarm reproduziert werden.

Als Nächstes wurde das Proliferationsverhalten unter Betrachtung von Zellzyklus-interagierenden Proteinen untersucht. Die einzelnen Kontrollpunkte der Interphase werden im Wesentlichen durch heterodimere Komplexe, bestehend aus Cyclinen und Cyclin abhängigen Kinasen (*Cyclin Dependent Kinases*= CDK) reguliert. Diese wiederum steuern durch Phosphorylierung von Protoonkogenen die Zellzyklusprogression. Auf der anderen Seite existieren analog hierzu Inhibitoren, wie beispielsweise p21 und p27, welche durch ihre hemmende Wirkung auf die Cyclin-CDK-Komplexe dem Fortschreiten des Zellzyklus entgegenwirken.

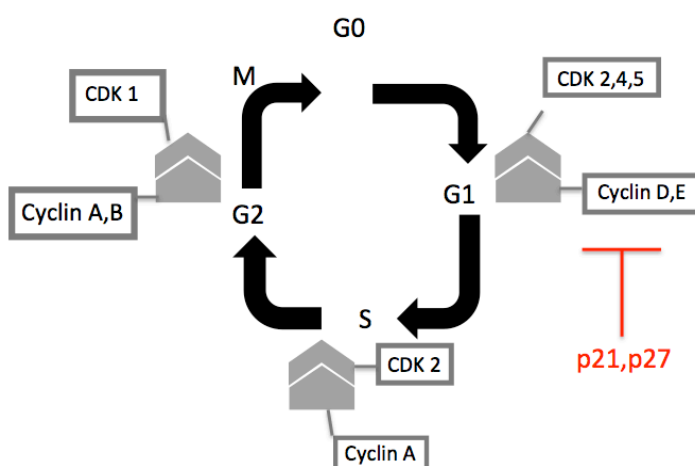


Abb. 9 Schematische Übersicht über eine Auswahl an Zellzyklus interagierenden Proteinen

CDK= Cyclin Dependent Kinase; M= Mitosephase; S= S-Phase; G1, G2= Kontrollpunkte der Interphase

Eine Auswahl an Genen, welche maßgeblich an diesem Zusammenspiel beteiligt sind, wurde hinsichtlich ihrer Expression in intestinalen Epithelzellen mit Hilfe der RT-PCR analysiert. So kontrollieren der Komplex aus Cyclin D1 und CDK4, sowie der CDK2-Inhibitor p21 die G1/S-Phasen-Transition und spielen eine wesentliche Rolle in der Wachstumsregulation intestinaler Epithelzellen (Beauchamp, et al. 1996). Es wurden im transgenen Modell signifikant höhere mRNA-Level für Cyclin D1 und p21 im Jejunum beobachtet, während hingegen im Colon nur Cyclin D1 erhöht war (Abb. 10). Für die CDK4 wurden keine erhöhten mRNA-Level detektiert. Aus dieser Konstellation ist lediglich die in der IHC für BrdU festgestellte, geringere Anzahl proliferierender Stammzellen im Jejunum erklärbar (siehe Abb. 8). Für das Colon geht (aufgrund der gleichzeitig nicht erhöhten CDK4) kein stimulierender Effekt von Reg3 β auf die Zellzyklusprogression hervor. Der Cyclin-E-CDK2-Komplex steuert ebenfalls den Übergang von der G1- in die S-Phase. Für diese beiden Proteine wurde eine tendenziell erhöhte, aber nicht signifikante Expression im transgenen Jejunum beobachtet.

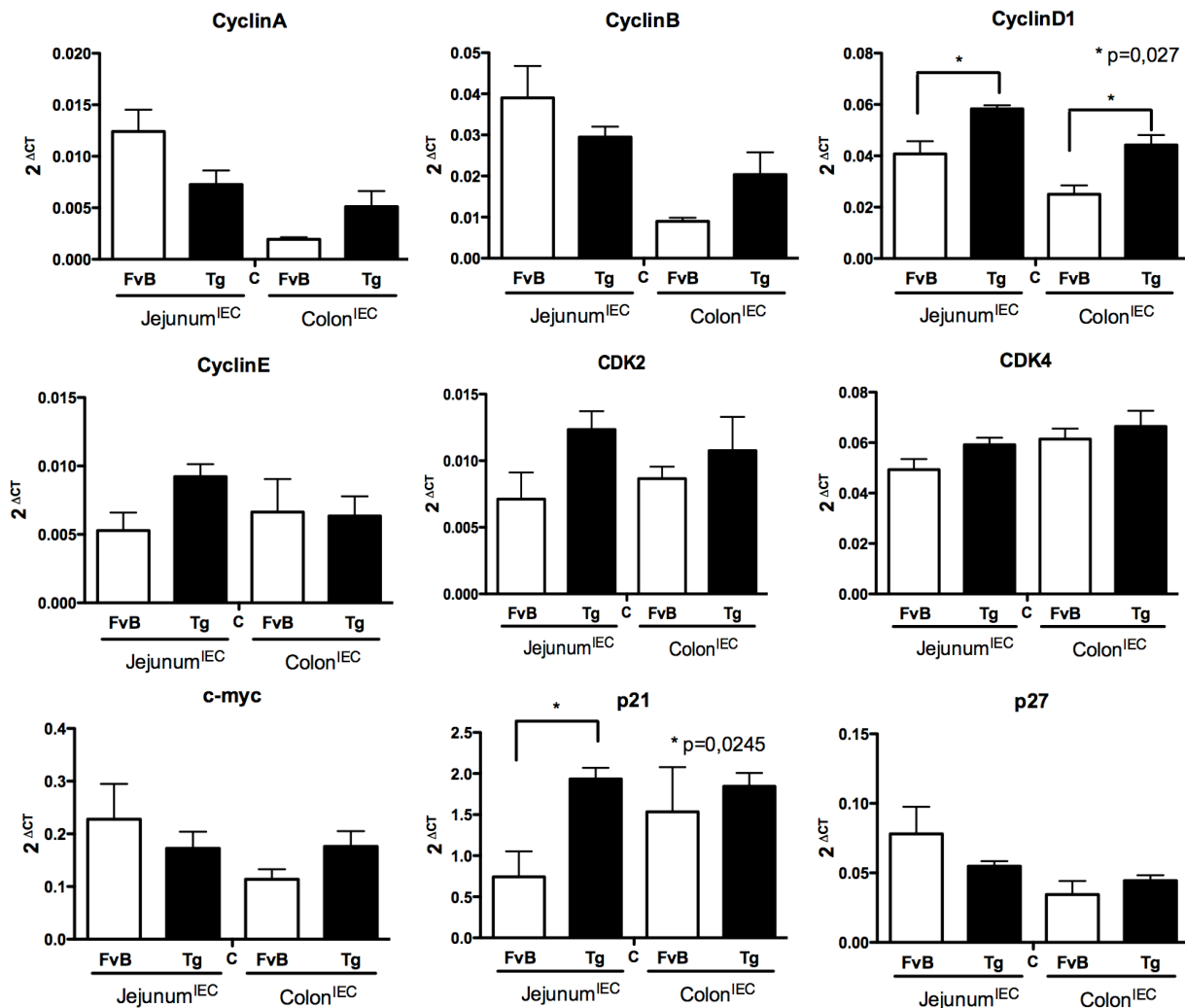


Abb. 10 Analyse der mRNA-Level von im Zellzyklus interagierender Proteine

Relative mRNA-Level von Proteinen, welche die Zellzyklusprogression steuern in transgenen Tieren (Tg= Tg(Vil-Reg3β)) und Wildtypen (FvB); Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. IEC= intestinal epithelial cells

C-myc ist ein weiteres Gen, welches frühzeitig bei Stimulation der Zellteilung durch Wachstumsfaktoren über MAP-Kinasen exprimiert wird. In pankreatischen Azinuszellen vom Typ AR42J wurde die MAP-Kinasen-abhängige Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren durch Reg3β demonstriert (Ferrés-Masó, et al. 2009). Da c-myc in dieser Analyse in transgenen Tieren nicht überexprimiert war, scheint Reg3β auf diesen Faktor allerdings keinen Einfluss zu nehmen.

4.3 Im transgenen Mausmodell zeigt sich gegenüber Wildtypen keine attenuierte Inflammation auf Ebene der Histologie und Expression proinflammatorischer Zytokine in einer DSS-induzierten Colitis

Eine sowohl akute wie auch chronische Colitis lässt sich in Mäusen mittels oraler Applikation von DSS induzieren (Becker, et al. 2004). Diese Substanz fördert durch Schädigung der epithelialen Barriere die Entstehung einer akut ulzerierenden Colitis mit maximaler Ausprägung am Tag Fünf. Um den Effekt einer transgenen Überexpression von Reg3 β im Frühstadium einer akuten Colitis zu charakterisieren und dadurch Aufschlüsse über die Übertragbarkeit der antiinflammatorischen Effekte von Reg3 β *in vitro* auf das Mausmodell gewinnen zu können, wurde transgenen Tg(Vil-Reg3 β)-Tieren 5 Tage nach initialer intraperitonealer AOM-Injektion 5 Tage lang 2,5% bzw. 3% DSS-haltiges Trinkwasser zugeführt. Weitere 5 Tage nach DSS-Applikation wurden die Versuchstiere geopfert und deren Colongewebe histologisch und biochemisch analysiert. Die anfänglich gewählte DSS-Konzentration von 3 % zeigte sowohl in der histologischen Auswertung als auch in der Analyse der Zytokinexpression keine signifikante Abweichung im transgenen Modell gegenüber Wildtypen (Ergebnisse nicht dargestellt). Unter der Annahme, dass die mit 3 % relativ hohe DSS-Konzentration im Trinkwasser möglicherweise eine zu drastische Colitis hervorgerufen und damit das hypothetisierte, antiinflammatorische Potential von Reg3 β überstiegen hatte, wurde das Experiment in zwei weiteren Gruppen mit einer niedrigeren DSS-Konzentration von 2,5 % wiederholt. Im transgenen Modell zeigte sich auch hierbei verglichen mit der Gruppe der Wildtypen kein Unterschied hinsichtlich der flächenmäßigen Ausbreitung der Ulzerationen und dem Schweregrad der Inflammation. Sowohl der Epithelzellschaden als auch die Infiltration inflammatorischer Zellen in Mucosa und Submucosa waren in Tg(Vil-Reg3 β)-Tieren gleich stark ausgeprägt. Demzufolge war der Gesamt-Colitis-Score bei den transgenen Tieren entgegen der anfänglichen Erwartung auch nicht signifikant erniedrigt (Abb. 11). Auf histologischer Ebene konnte somit kein protektiver Effekt von Reg3 β im murinen Colitis-Modell beobachtet werden, was sich auch in der Körpergewichtsentwicklung im Verlauf der Behandlung widerspiegelte. Dabei zeigten die transgenen Tiere eine etwa gleichermaßen drastische Gewichtsabnahme wie die Kontrollen, lediglich am ersten Folgetag nach dem Maximum der Inflammation (Tag

6) wurde eine geringere Gewichtsabnahme beobachtet. Schon einen Tag später war diese allerdings wieder ähnlich stark ausgeprägt wie in der Kontrollgruppe, was gegen einen regenerativen Effekt von Reg3 β im transgenen Modell spricht.

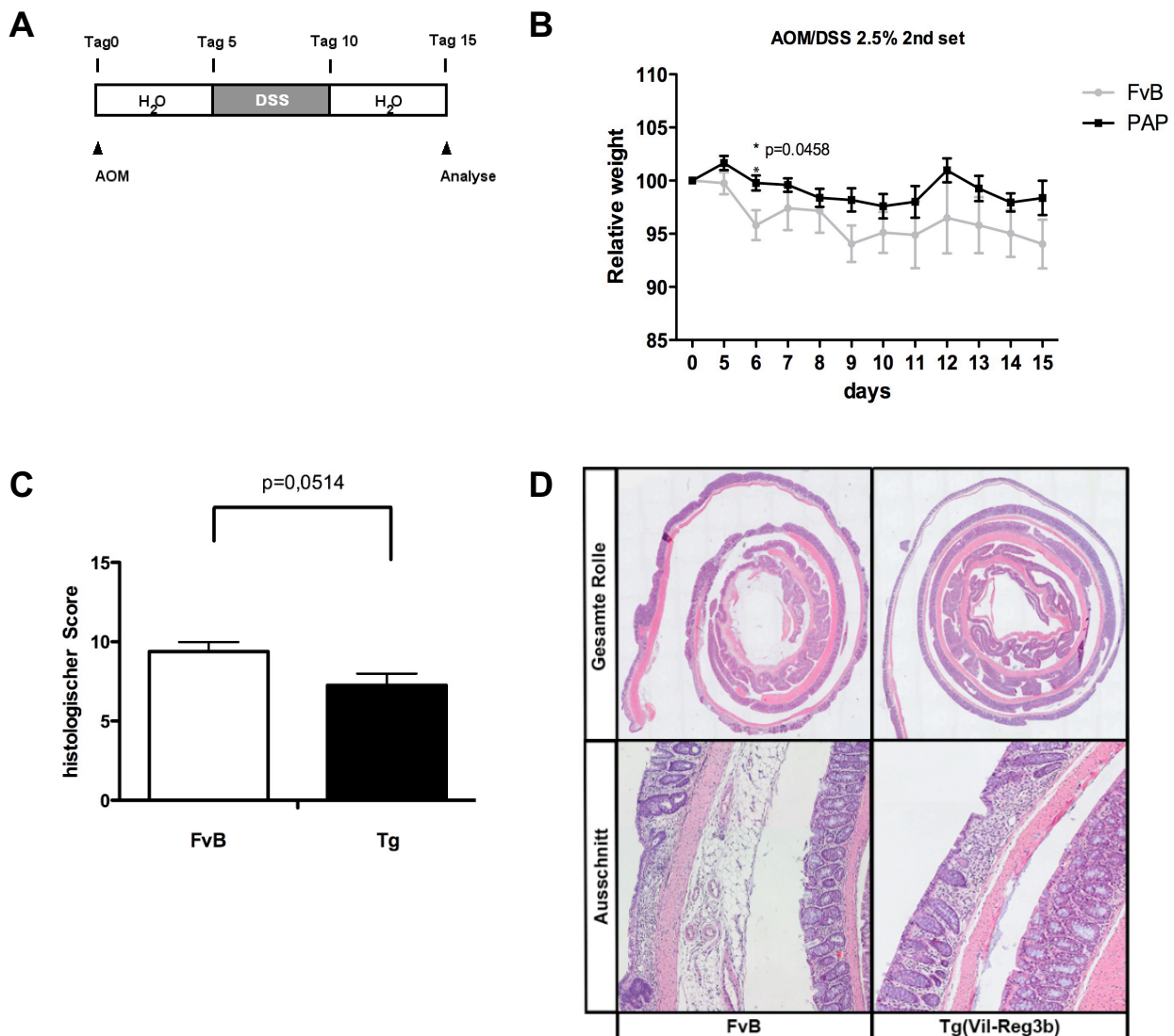


Abb. 11 Zusammenschau der Ergebnisse bei der Induktion einer Colitis mit 2,5 % DSS

(A) Behandlungsschema mit DSS; (B) Übersicht über die Veränderungen des Körpergewichts während der Behandlung; (C) Graphische Darstellung des Gesamt-Colitis-Scores; Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (D) ausgewählter Abschnitt histologischer H&E-Färbungen in entzündeten Arealen; Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt FvB= Kontrollen, Tg= Tg(Vil-Reg3 β)

Um die Auswirkungen der akuten Entzündung auf die Expression von Reg3 β und pro- bzw. antiinflammatorischer Zytokine während des Verlaufs einer Colitis zu untersuchen, wurden Stufenbiopsien vom distalen Drittel des Colons entnommen und entsprechende mRNA-Level mittels RT-PCR analysiert. Die proinflammatorische Achse wurde auf die klassische Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NF κ B hin untersucht. In CED führt die vermehrte Aktivität von NF κ B zur einer übersteigerten Expression entzündungsfördernder Zytokine, wie TNF α , IL-1 und IL-6 in Makrophagen (Atreya, et al. 2008). Um darüber hinaus das Rekrutierungsverhalten von Immunozyten beurteilen zu können, wurden die Chemokine und murinen IL-8-Analoga MIP2, KC, so wie das Adhäsionsprotein ICAM1 als Marker aktiver Transmigration ausgewählt. Die Chemokine MIP2 und KC sind der CXC-Familie zugehörig, werden ebenfalls durch NF κ B aktiviert und üben eine chemotaktische Wirkung vorwiegend auf neutrophile Granulozyten aus (Moser, et al. 1990; Schumacher, et al. 1992). KC wird gleichermaßen in Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen produziert (Becker, et al. 1994; Iida and Grotendorst 1990), wohingegen die MIP2 α -Expression auf monozytäre Zellen beschränkt ist (Wolpe, et al. 1989). ICAM1 wird im Rahmen von Entzündungen durch IL-1 und TNF α induziert und ist als ein transmembranäres Protein aus der Superfamilie der Immunglobuline an der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen beteiligt. In Bezug auf antiinflammatorisch wirksame Botenstoffe waren vor allem die Zytokine IL-10, IL-11 und IL-22 von Interesse, da diese sowohl in murinen Colitis-Modellen, als auch beim Menschen das Entzündungsgeschehen im Rahmen einer CED attenuieren (Bozza, et al. 2001; Leach, et al. 1999; Sugimoto, et al. 2008).

Unter der Induktion einer Colitis mit DSS konnten insgesamt keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen beobachtet werden. Auch Reg3 β selbst war sowohl in der Gruppe der unbehandelten als auch der behandelten Tiere nicht signifikant überexprimiert. In der Histologie wurde lediglich eine leicht schwächer ausgeprägte Infiltration von inflammatorischen Zellen in Colitis-Arealen im transgenen Modell beobachtet (nicht dargestellt), was sich allerdings auf mRNA-Ebene hinsichtlich der Expression von KC, MIP2 und ICAM1 nicht bestätigte. In Bezug auf die mRNA-Level von TNF α wurden ebenfalls keine Unterschiede zu den Wildtypen festgestellt. In der Summe wurde somit keine Attenuierung der intestinalen Entzündungen durch die transgene Überexpression von Reg3 β beobachtet.

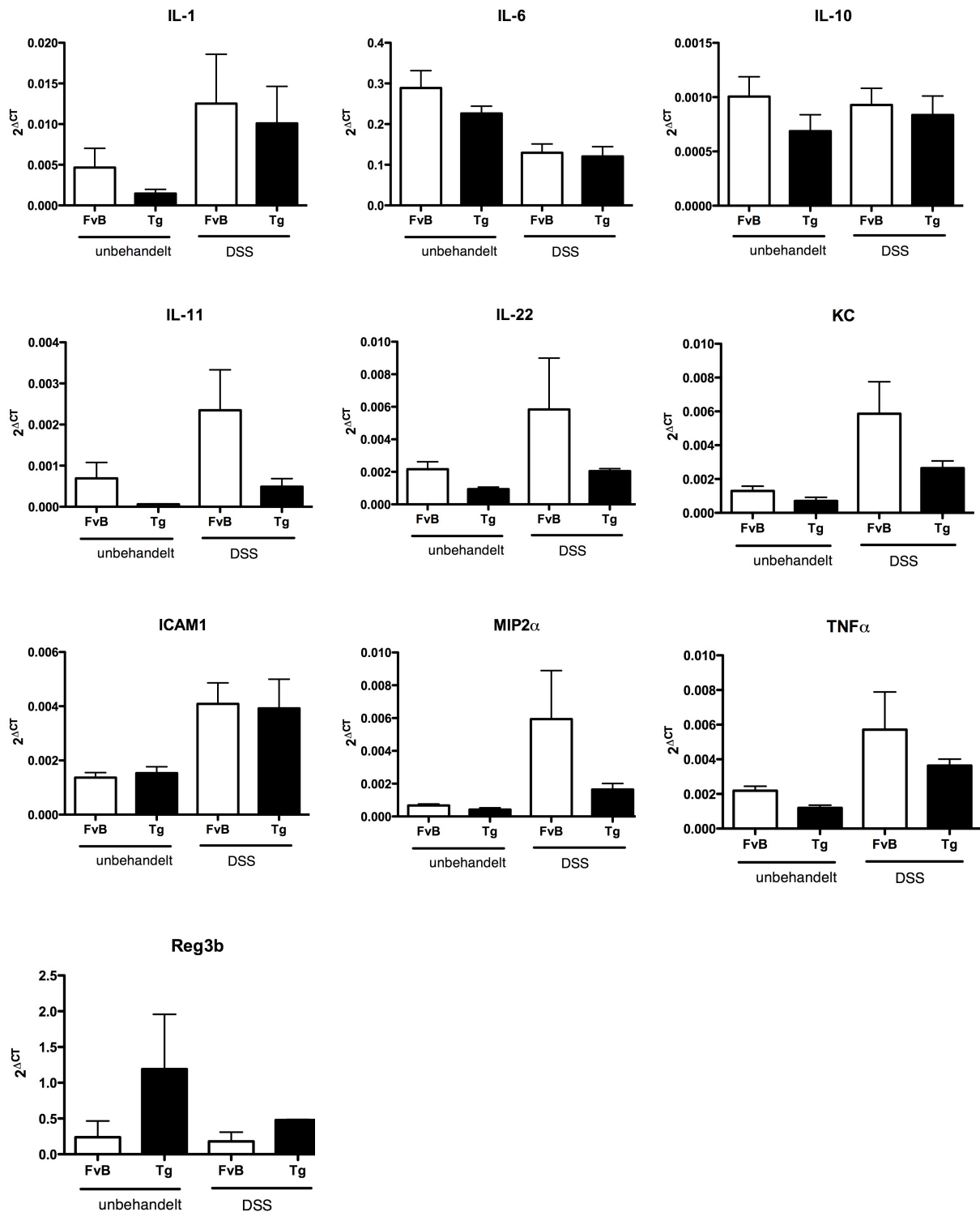


Abb. 12 Expression verschiedener Zytokine unter Induktion einer akut ulzerierenden Colitis mit DSS

Dargestellt sind die mRNA-Level einer Auswahl an Zytokinen aus Stufenbiopsien des distalen Colondrittels. Gegenübergestellt sind mit DSS behandelte und unbehandelte Tiere. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt; FvB=Wildtypen, Tg= Tg(Vil-Reg3 β), unbehandelt= normales Trinkwasser ohne DSS-Zusatz, DSS= 2,5 % DSS im Trinkwasser

4.4 Bei der Induktion eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms wirkte die transgene Überexpression von Reg3 β weder pro- noch antitumorigen

Auf dem Boden einer chronischen Colitis kann sich über einen bestimmten Zeitraum das kumulative Risiko für die Entstehung eines Colonkarzinoms erheblich erhöhen (Eaden, et al. 2001). Für Reg3 β sind Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF κ B beschrieben worden (Closa, et al. 2007; Folch-Puy, et al. 2006), welche Promotion und Progression des CAC beeinflussen (Bollrath and Greten 2009). Es wurde deshalb weiterhin untersucht, inwieweit sich die transgene Überexpression von Reg3 β im Verlauf einer chronischen Entzündung im Dickdarm auf die Entstehung eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms auswirkt.

Durch die wiederholte Gabe von DSS in Kombination mit der mutagenen Substanz Azoxymethan (AOM) kann über einen Zeitraum von ca. 80 Tagen die Entstehung eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms provoziert werden (Clapper, et al. 2007). Dementsprechend wurde Tg(Vil-Reg3 β)-Mäusen zusammen mit Wildtypen in insgesamt 3 Zyklen Trinkwasser mit schrittweise reduzierter DSS-Konzentration verabreicht. Nach initialer AOM-Injektion am Tag 0 erfolgte zusätzlich eine zweite AOM-Gabe am Tag 22. Vor der Opferung der Versuchstiere am Tag 84 wurde eine Rektoskopie zur Kontrolle der Tumorpräsenz durchgeführt. Die histologische Auswertung der Colontumore erfolgte anhand von Serienschnitten der einzelnen Präparate. Im transgenen Modell zeigten die Tiere rektoskopisch keine Unterschiede in der makroskopischen Ausprägung der Tumore. In der histologischen Auswertung wurde kein signifikanter Unterschied in der absoluten Tumorinzidenz festgestellt. Auch die Betrachtung der kumulativen Tumorfläche bei der Unterteilung in Mikro- und Makrotumore ergab keinen Unterschied (Abb. 13).

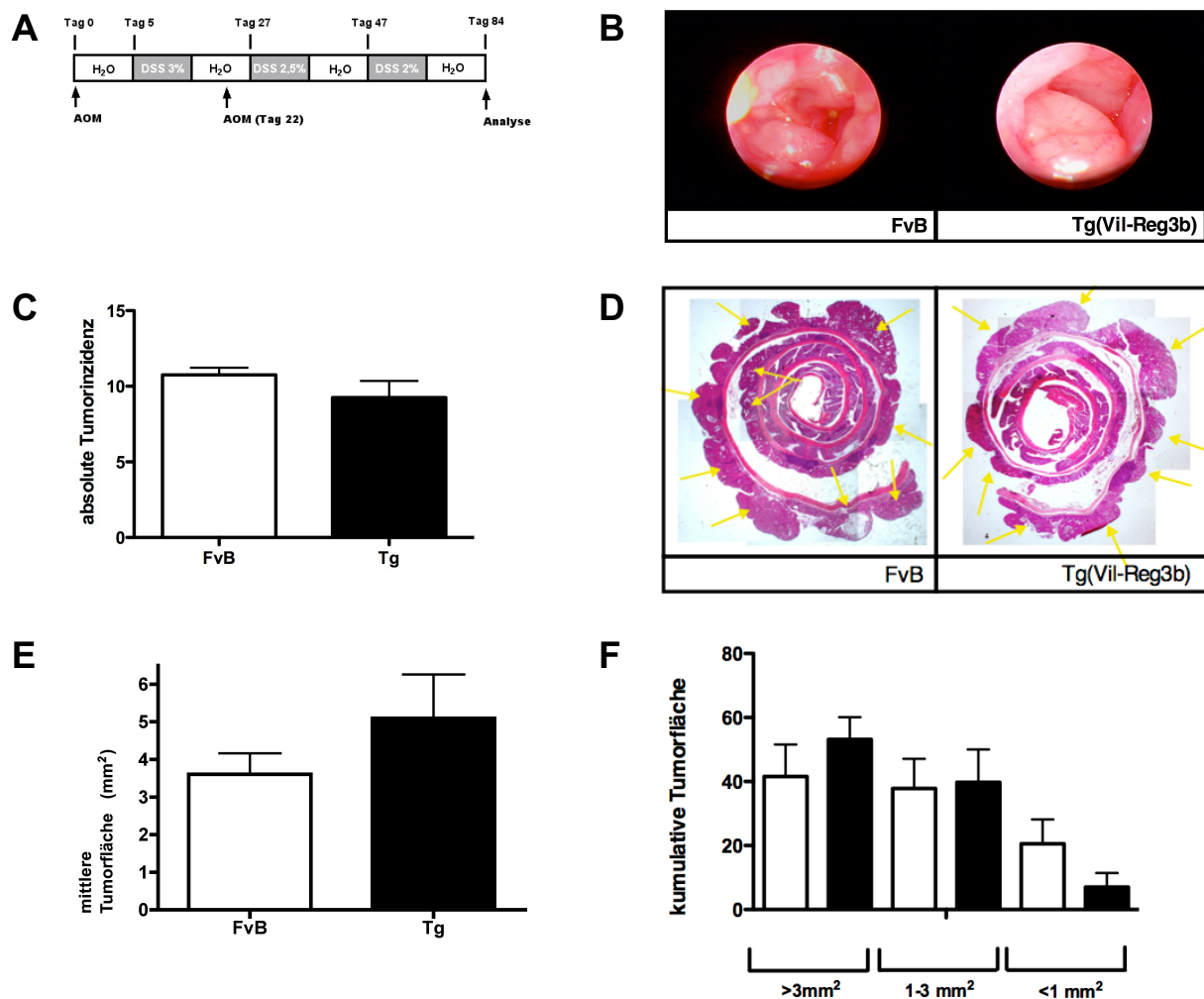


Abb. 13 Zusammenfassung der histologischen und makroskopischen Ergebnisse bei der Induktion eines CAC

(A) Schematische Übersicht über das Behandlungsschema zur Induktion einer CAC; (B) rektoskopische Untersuchung der Versuchstiere am Tag 84 zur makroskopischen Beurteilung der Tumore; (D) histologische H&E-Färbung ausgewählter Tumorabschnitte (Einzelbilder wurden zusammengefügt) mit systematischer Auswertung der absoluten Tumorzinzidenz (C) und mittleren Tumorfläche (E). Darstellung der kategorisierten Tumorgröße (F). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. FvB=Kontrollen, Tg=Tg(Vil-Reg3 β)

Um das Proliferations- bzw. Apoptoseverhalten in neoplastischen Arealen genauer bestimmen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen gegen BrdU, phosphoryliertes Histon H3 und cleaved Caspase 3 angefertigt und entsprechend positiv gefärbte Zellen in einer definierten Fläche ausgezählt. Wie im Abschnitt der Grundcharakterisierung bereits erwähnt wurde, ist BrdU ein Antimetabolit, welcher

die zelluläre S-Phase markiert. Das Histon H3 ist während der mitotischen Kondensation von DNA phosphoryliert und in diesem Zustand ebenfalls Ausdruck proliferativer Aktivität. Die Auswertung dieser beiden Mitosemarker lieferte insgesamt keine signifikanten Ergebnisse dafür, dass in Tumoren transgener Mäuse ein stärkeres Proliferationsverhalten vorherrscht. Bei Betrachtung der immunhistochemischen Färbung gegen cleaved Caspase 3 konnte in den neoplastischen Arealen von Tg(Vil-Reg3 β)-Mäusen ebenfalls keine signifikante Abweichung in Bezug auf die Anzahl apoptotischer Zellen detektiert werden (Abb. 14). Insgesamt waren auch hier die Ergebnisse der histologischen bzw. immunhistochemischen Auswertung durchgehend nicht signifikant abweichend und lassen deshalb keine pro- oder antitumorogene Wirkung von Reg3 β in der Pathogenese des CAC erkennen.

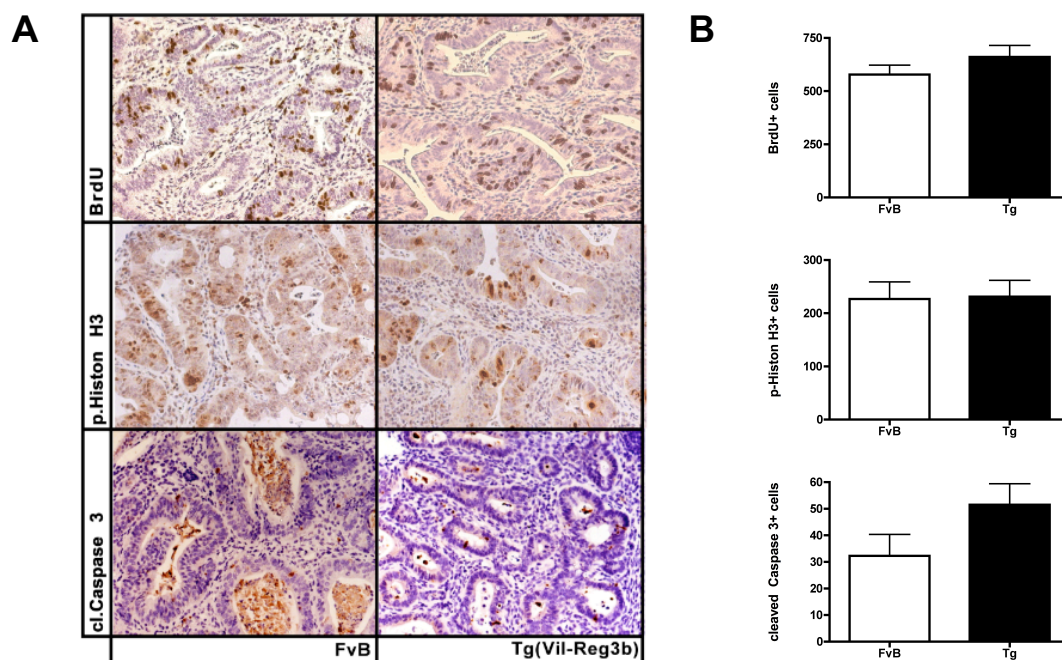


Abb. 14 Untersuchung von Proliferation und Apoptose in neoplastischen Arealen im CAC-Modell

(A) Immunhistochemische Darstellung der Mitosemarker BrdU und p-Histon, so wie Untersuchung des Apoptoseverhaltens durch Färbung gegen cl-Caspase 3. (B) Auszählung der entsprechend positiv gefärbten Zellen in neoplastischen Arealen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. FvB=Kontrollen, Tg=Tg(Vil-Reg3 β)

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Einblick über das Verhalten des C-Typ-Lektins Reg3 β in Bezug auf die intestinale Zellhomöostase, die akute Colitis und das Colitis-assoziierte Colonkarzinom im Mausmodell. Die gemachten Befunde stützen sich dabei auf die Charakterisierung der transgenen Mauslinie Tg(Vil-Reg3 β), in welcher Reg3 β im gesamten Intestinum epithelspezifisch unter Kontrolle des Villin-Promotors überexprimiert wird. In unbehandelten Tg(Vil-Reg3 β) Tieren zeigte sich, dass die transgene Überexpression hierbei keinen Einfluss auf die Proliferation oder Differenzierung von intestinalen Stammzellen nimmt. Weiterhin war bei der Induktion einer akuten Colitis unter Betrachtung des histologischen Gewebes Schadens und der Expression entzündungsassoziierter Zytokine das Ausmaß der Inflammation in transgenen Tieren nicht verändert, weswegen die Hypothese einer protektiven Wirkung von Reg3 β in diesem Zusammenhang nicht verifiziert werden konnte. Dies steht im Widerspruch zu den bisherigen Forschungsarbeiten, in welchen Reg3 β mehrheitlich regenerative und antiinflammatorische Wirkungen aufzeigt (Gironella, et al. 2005; Closa, et al. 2007). Darüber hinaus wurde im Hinblick auf die Entwicklung eines Colitis-assoziierten Colonkarzinoms in der transgenen Mauslinie kein Unterschied bezüglich Tumorzinzidenz oder Tumorgroße festgestellt. Bei der genaueren Betrachtung von Proliferation und Apoptose in neoplastischen Arealen transgener Tiere zeigte sich hierbei kein Unterschied zu den Wildtyp-Kontrollen. Da Dauer und Schweregrad der Entzündung entscheidende Risikofaktoren für die Entwicklung eines CAC sind, ist die ausbleibende Attenuierung einer akuten Colitis in Tg(Vil-Reg3 β) Tieren ein möglicher Grund für diesen Befund. Unter Ausklammerung dieser möglichen Ursache sprechen allerdings die vielseitigen Interaktionen von Reg3 β mit tumorrelevanten Signalwegen eher für dessen Eingreifen in die Karzinogenese im Colon.

Das Lektin Reg3 β wird im intestinalen Epithel von fast allen Zelltypen (Paneth-Zellen ausgenommen) gebildet und als para- bzw- autokriner Botenstoff sezerniert (Burger-van Paassen, et al. 2012). Hinsichtlich der Zellhomöostase geht man bisher von einer mitogenen (Moucadel, et al. 2001) und antiapoptotischen Funktion von Reg3 β aus (Malka, et al. 2000), welche im Zuge der Epithelerneuerung nach verletzenden

Stimuli eine Rolle spielen könnte. In pankreatischen Azinuszellen beispielsweise wird Reg3 β nur dann exprimiert, wenn ein Zellschaden durch Entzündung, Hypoxie oder Toxine verursacht wurde (Closa, et al. 2007). Ein weiteres Beispiel für die Induzierbarkeit von Reg3 β lieferten Burger-van Paassen et al., welche in Muc2-defizienten Mäusen eine Hochregulierung von Reg3 β in Becherzellen beobachten konnten (Burger-van Paassen, et al. 2012). In weiteren nicht-intestinalen Geweben zeigt Reg3 β ebenfalls regenerative Wirkungen. So demonstrierten Simon et al. eine Reg3 β -vermittelte Stimulation der Leberzellregeneration nach partieller Hepatektomie (Simon, et al. 2003), Marz-Weiss et al. konnten zeigen, dass die Neurogenese nach traumatischen Hirnschäden ebenfalls durch Reg3 β getriggert scheint (Marz-Weiss, et al. 2011) und Okotmoto schrieb Reg3 β eine bedeutende Rolle beim Wachstum pankreatischer Beta-Zellen zu (Okamoto 1999). Moucadel et al. konnten *in vitro* zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Cdx1 die Expression von Reg3 β stimuliert und hierüber das Wachstum intestinaler Epithelzellen angeregt wird (Moucadel, et al. 2001). Aufgrund der Befunde in Zellkulturversuchen an pankreatischen AR42J Azinuszellen wurde von Ferrés-Masó et al. vorgeschlagen, dass Reg3 β seine regenerativen Funktionen über die MAP-Kinasen-abhängige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3, ETS2 und EGR1 ausübt, welche u.a. Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose regulieren (Ferrés-Masó, et al. 2009). Auch Closa et al. bestätigen in derselben Zelllinie die JAK-abhängige Aktivierung von STAT3 im Signalweg von Reg3 β (Closa, et al. 2007). Gegen eine Involvierung von STAT3 in Bezug auf die regenerative Funktion von Reg3 β sprechen allerdings die Befunde von Bollrath et al., wonach die selektive Ablation von STAT3 in intestinalen Epithelzellen die Entwicklung und Funktion des Darms im Hinblick auf Stammzellproliferation und -differenzierung unbeeinflusst lässt, weswegen die anderen Transkriptionsfaktoren im MAP-Signalweg für die zellhomöostatische Funktion von Reg3 β verantwortlich sein müssten (Bollrath, et al. 2009). In der hier verwendeten transgenen Mauslinie Tg(Vil-Reg3 β) wurde sowohl histologisch, als auch auf mRNA-Ebene kein Unterschied hinsichtlich Differenzierung und Proliferation intestinaler Stammzellen beobachtet (siehe Abschnitt 4.2). Eine STAT3- bzw. MAP-Kinasen-Aktivierung wurde nicht untersucht.

Die intestinalen Stammzellen teilen sich im proliferativen Kompartiment der Krypten physiologischerweise ca. alle 24 Stunden (Folch-Puy, et al. 2006) und stoppen ihr

Wachstum während der apikalen Migration durch interzelluläre Kontaktinhibition. Der Komplex aus Cyclin D1 und CDK4, sowie der CDK2-Inhibitor p21 kontrollieren bei diesem Prozess die G1/S-Phasen-Transition und spielen eine wesentliche Rolle in der Wachstumsregulation intestinaler Epithelzellen (Beauchamp, et al. 1996). In der transgenen Mauslinie Tg(Vil-Reg3 β) war die Expression von Cyclin D1 zwar signifikant erhöht, allerdings zeigte sich kein Unterschied in der relativen mRNA-Menge für das Enzym CDK4. Im Jejunum transgener Versuchstiere war gleichzeitig p21 signifikant erhöht exprimiert, was eher für einen proliferationshemmenden Einfluss spricht. Passend hierzu wurden in der immunhistochemischen Anfärbung gegen BrdU im Jejunum weniger Zellen in der S-Phase detektiert. Im Colon verhielt sich dieser Trend genau anders herum. Numerisch war dieser Unterschied in beiden Darmabschnitten allerdings minimal. Aus der Konstellation im Expressionsprofil von Tg(Vil-Reg3 β)-Tieren lässt sich insgesamt somit keine eindeutige Beeinflussung der Zellzykluskontrolle erkennen. Die histologische Analyse des Stammzellmarkers OLFM4 ergab in transgenen Tieren ebenfalls keine von Wildtypen abweichende Expression, was die Ergebnisse aus der RT-PCR-Auswertung unterstreicht. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass die Familie der Reg-Proteine über Stimulation der G1/S-Phasen-Transition zur Zellproliferation und damit Regeneration verschiedener Gewebe beitragen. Im Pankreas beispielsweise wird auf diese Weise das Wachstum von β -Zellen stimuliert, indem durch die Isoform Reg3 α die Expression von Cyclin D1 und CDK4 gesteigert wird (Cui, et al. 2009). Weiterhin besitzt der Promotor von Reg3 β ein responsives Element für den Transkriptionsfaktor Cdx1 (Moucadel, et al. 2001), welcher bei der Proliferation und Differenzierung intestinaler Stammzellen aktiviert wird (Subramanian, et al. 1998). Anhand von Zelllinien colorektaler Tumore postulierten Bernard-Perrone et al., dass Reg3 β dem Prozess der Differenzierung tendenziell eher entgegenwirkt (Bernard-Perrone, et al. 1999). Demnach müsste die transgene Überexpression in der Mauslinie Tg(Vil-Reg3 β) die Differenzierung intestinaler Stammzellen eher inhibieren als fördern. In der Grundcharakterisierung dieses Modells sprechen allerdings sowohl der histologische Befund, als auch die RT-PCR-Analyse der Zelllinienmarker gegen diese Hypothese. Da zusammenfassend hinsichtlich Proliferation und Differenzierung keine Wirkung in Tg(Vil-Reg3 β) Tieren nachgewiesen werden konnte, sind möglicherweise negative Rückkopplungsmechanismen in intestinalen Epithel- und Stammzellen aktiv, welche unter physiologischen Bedingung die

Funktionen von Reg3 β homöostatisch maßregeln, weshalb dessen Wirkung selbst bei transgener Überexpression unterdrückt wird. Da die transgene Reg3 β -Sequenz nur in Abhängigkeit des Villin-Promotors exprimiert wird, müssten etwaige Funktionshemmungen nicht auf transkriptioneller Ebene wirken, sondern direkt in die Signalkaskade von Reg3 β eingreifen. Im Stimulationsversuch von Moucadel et al. beispielsweise verhielt sich die wachstumsfördernde Wirkung von Reg3 β nicht linear zu dessen Konzentration, sondern fiel nach einem mittleren Maximum wieder ab, was für einen solchen Inhibitionsmechanismus sprechen könnte (Moucadel, et al. 2001).

Im Gastrointestinaltrakt wird die Expression von Reg3 β mit einer antiinflammatorischen und regenerativen Wirkungsweise in Zusammenhang gebracht (Gironella, et al. 2005; Closa, et al. 2007). Reg3 β fiel als sekretorisches Protein zuerst durch seine entzündungshemmende Wirkung in experimentell induzierten Pankeatitiden auf, woher seine ursprüngliche Bezeichnung als „Pankreatitis-assoziiertes-Protein 1“ herrührt (Keim, et al. 1984). Auch bei Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen, so wie in DSS-induzierten Colitiden im Mausmodell beobachtet man eine zunehmende Expression von Reg3 β , wobei dessen Serum-Konzentration bei CED-Patienten mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung steigt (Gironella, et al. 2005; te Velde, et al. 2007). Dies ist womöglich darauf zurückzuführen, dass die Expression von Reg3 β in intestinalen Epithelzellen im Rahmen einer Entzündung durch die Zytokine IFN γ , IL-6, IL-10 und IL-22 induziert wird (te Velde, et al., 2007; Zhang, et al. 2008).

Bei der Untersuchung der transgenen Reg3 β -Überexpression im Rahmen einer DSS vermittelten, akut ulzerierenden Colitis, ergab sich allerdings in der Gruppe der Tg(Vil-Reg3 β)-Tiere während eines Beobachtungszeitraums von 15 Tagen bezüglich der Ausprägung der Inflammation kein Unterschied zu Wildtypkontrollen. Die Auswertung der Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine auf mRNA-Ebene zeigte dabei insgesamt widersprüchliche Ergebnisse. Da DSS behandelte Tiere im Hinblick auf Histologie und Gewichtsverlust eindeutig mit dem Bild einer schweren Colitis imponierten, müssten proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β und IL-6, so wie die chemotaktischen Botenstoffe KC und MIP2 α zumindest in behandelten gegenüber unbehandelten Wildtypen erhöht sein (Perse and Cerar 2012). Das Muster der Zytokinexpression aus diesem Versuch ist demzufolge nicht

plausibel (siehe Abb.10). Nichtsdestotrotz aber widersprechen zumindest die histologischen Befunde dieser Mauslinie den aktuellen Hypothesen über die Funktionen von Reg3 β , denen zufolge mehrheitlich dessen regenerative und v.a. antiinflammatorische Wirkung postuliert wird. Reg3 β beeinflusst demnach hauptsächlich Mechanismen des angeborenen Immunsystems, welches für die Initiation der Entzündung in CED verantwortlich gemacht wird (Xavier and Podolsky 2007). Anhand von pankreatischen AR42J-Zellen und *ex vivo* Versuchen an CED-Biopsien wurde demonstriert, dass im Signalweg von Reg3 β die Aktivität der Transkriptionsfaktoren STAT3 (Folch-Puy, et al. 2006; Closa, et al. 2007) und NF κ B (Vasseur, et al. 2004) beeinflusst wird, worüber sich dessen Wirkung auf das Entzündungsgeschehen erklären lässt. Nach Folch-Puy et al. führt demnach die Bindung an den Reg3 β -Rezeptor durch die Interleukine IL-6, IL-10 und IL-22, sowie durch Reg3 β selbst zur Aktivierung des JAK/STAT3-Signalweges (Folch-Puy, et al. 2006). Vermittelt durch Janus-Kinasen kommt es hierbei zur Phosphorylierung von STAT3-Monomeren, welche nach Homodimerisierung nukleär transloziert werden und dort ihre transkriptionelle Aktivität entfalten. Über STAT3 ist bekannt, dass es im Rahmen von CED ähnlich wie NF κ B pleiotrope Effekte besitzt, je nachdem in welchen Zellen der Transkriptionsfaktor agiert (Sugimoto, 2008; Greten, et al. 2004). So trägt STAT3 in colonischen Epithelzellen zur mucosalen Integrität bei und attenuiert die entzündliche Aktivität von Makrophagen (Sugimoto, 2008). Eine selektive Ablation von STAT3 in diesen beiden Zelltypen resultiert dementsprechend in der Ausbildung einer intestinalen Inflammation (Alonzi, et al. 2004; Takeda, et al. 1999). Für das Interleukin IL-22 ist bekannt, dass seine protektive Wirkung während einer experimentellen DSS Kolitis auf eine gleichzeitige Induktion von STAT3 und Reg3 β zurückzuführen ist (Sugimoto, et al. 2008; Zheng, et al. 2008). Ähnlich wie das Interleukin IL-10 induziert Reg3 β in seinem Signalweg die Transkription des STAT3-Inhibitors SOCS-3 und wirkt hierüber einerseits negativ rückkoppelnd auf seine eigene Aktivierung und andererseits entzündungshemmend durch Suppression proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-6 (Folch-Puy, et al. 2006). Vasseur et al. konnten weiterhin zeigen, dass Reg3 β seine antiinflammatorische Funktion zusätzlich durch Inhibition der TNF α vermittelten NF κ B-Aktivierung ausüben vermag (Folch-Puy, et al. 2006; Vasseur, et al. 2004). Gironella et al. wiesen diese Wirkung von Reg3 β schließlich auch in Epithel-, Endothel-, und myeloischen Zellen aus Colonbiopsien von Morbus Crohn Patienten nach (Gironella,

et al. 2007). In derselben Versuchsreihe waren nach Zugabe von exogenem Reg3 β dementsprechend u.a. die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6, sowie die Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 signifikant niedriger exprimiert (Gironella, et al. 2005). Diese Beobachtungen konnten in der Tg(Vil-Reg3 β)-Mauslinie allerdings nicht bestätigt werden. Trotz transgener Überexpression von Reg3 β waren in den RT-PCR-Analysen demnach TNF α , IL-1 β und IL-6, sowie die murinen IL-8-Analoga KC, MIP2 α und das Zelladhäsionsprotein ICAM1 in Gesamtmucosabiopsien gegenüber behandelten Wildtypen nicht reduziert. Dies widerspricht den Ergebnissen von Gironella et al. nur bedingt, da in dessen Untersuchungen lediglich die Gruppe der Morbus Crohn Patienten eine signifikante Reduktion der o.g. Zytokine/Faktoren aufwies. Die DSS induzierte Colitis entspricht bezüglich den pathogenetischen Abläufen allerdings eher dem Bild einer Colitis Ulcerosa (Cooper, et al. 1993); (Okayasu, et al. 1990), weswegen der Einfluss von Reg3 β hierbei womöglich anders ausfällt. Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, ist die Wirkung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF κ B im Rahmen einer Colitis abhängig vom Zelltyp, in welchem sie aktiviert werden. Reg3 β ist ein sekretorisches Protein, für welches mehrere Zellarten Rezeptoren exprimieren, weswegen es seine pleiotropen Effekte nicht nur in myeloischen, sondern auch in intestinalen Epithelzellen ausübt (Gironella, et al. 2005). Die Induktion von STAT3 und die gleichzeitige Inhibition von NF κ B entfaltet Reg3 β demnach höchstwahrscheinlich relativ zellunspezifisch, weswegen nicht nur potenziell protektive Einflüsse zum Tragen kommen. So wirkt sich die Aktivierung von STAT3 im angeborenen Immunsystem einerseits positiv auf den Verlauf einer Colitis aus, während es andererseits auf Seite des adaptiven Immunsystems IL-6-abhängig zu einem verlängerten Überleben pathologischer T-Lymphozyten beiträgt (Sugimoto, 2008). Es ist allerdings nicht bekannt, inwiefern auch Lymphozyten Rezeptoren für Reg3 β besitzen. Ausserdem ist für die Initiation einer Colitis eher das angeborene Immunsystem verantwortlich (Xavier and Podolsky 2007), weswegen dieser negative Effekt von STAT3, insofern er tatsächlich durch Reg3 β in T-Zellen induzierbar sein sollte, womöglich erst im späteren Verlauf der Erkrankung zum Vorschein kommt. Weiterhin ist die entzündungshemmende Wirkung von Reg3 β über die JAK/STAT3/SOCS3-Achse nicht an intestinalen Zellen demonstriert worden, sondern stützt sich hauptsächlich auf *in vitro* Befunde an pankreatischen Tumorzellen vom Typ AR42J. Diese Zelllinie besitzt im Bezug auf intrazelluläre

Signalwege die Grundeigenschaften von exokrinen Azinuszellen im Pankreas und antwortet auf zellulären Stress u.a. mit einer starken Induktion von Reg3 β (Duseti, et al. 1995). Möglicherweise ist die Physiologie dieser Zelllinie nicht mit derjenigen von intestinalen Epithelzellen vergleichbar, weswegen sich die Ergebnisse von Closa und Folch-Puy et al. nicht auf die transgene Überexpression von Reg3 β im murinen Colon übertragen lassen. Weiterhin müssen bei der Betrachtung der beschriebenen Reg3 β -Funktionen neben dem Zusammenspiel mit STAT3 auch noch dessen andere Interaktionen, insbesondere mit dem Transkriptionsfaktor NF κ B, berücksichtigt werden. Dieser wird über zwei Signalwege - zum einen klassisch u.a. über das Enzym IKK β und zum anderen kanonisch über IKK β -unabhängige Mechanismen- aktiviert. Der klassische Signalweg wird durch proinflammatorische Zytokine getriggert und nimmt bezüglich der Pathogenese von CED eine ambivalente Position ein. So demonstrierten Eckmann et al., dass die IKK β -vermittelte NF κ B-Aktivierung in intestinalen Epithelzellen die Entzündung während der akuten Phase einer Colitis attenuiert und erst im chronischen Verlauf aggraviert (Eckmann, et al. 2008). In der Anfangsphase trägt NF κ B durch Hemmung der Apoptose und Rekrutierung inflammatorischer Zellen, welche zytoprotektive Botenstoffe sezernieren, zum Erhalt der intestinalen Integrität während des Regenerationsprozesses einer akuten Colitis bei (Eckmann, et al. 2008). Bei der transgenen Überexpression von Reg3 β könnten somit die protektiven Wirkungen der STAT3/SOCS3-Aktiveringung durch die epitheliale Inhibition von NF κ B wieder nivelliert worden sein.

In diversen gastrointestinalen Tumorentitäten, wie dem Magen-, Pankreas-, und Colonkarzinom, kann in Gewebsanalysen ein vermehrtes Vorhandensein von Reg3 β beobachtet werden (Motoo, et al. 1998). Hinsichtlich des Colonkarzinoms wurde Reg3 β im SCC beim Menschen (Cao, et al. 2009) und im CAC anhand des AOM/DSS-Mausmodells (Bollrath, et al. 2009) nachgewiesen, wobei über den Einfluss von Reg3 β auf die Mechanismen der Karzinogenese noch Unklarheit herrscht. In dieser Arbeit zeigte sich unter einer transgenen Überexpression von Reg3 β bei der Provokation eines CAC mit AOM und DSS in Bezug auf Tumorinzidenz und Tumorgröße kein Unterschied zu den Kontrollen. Weiterhin ergab die immunhistochemische Analyse entsprechender neoplastischer Areale auch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Proliferations- oder

Apoptoseverhaltens entarteter Zellen, weswegen sich Reg3 β in diesem Modell nicht auf die Tumorigenese des CAC auswirkte. Unter Berücksichtigung der bisherigen Forschungsergebnisse wurde dies jedoch nicht erwartet, da diesen zufolge Reg3 β in tumorrelevante Signalwege des CAC involviert ist. Ähnlich wie im Falle der akuten Colitis ist hierbei die Induktion von STAT3 und die Inhibition von NF κ B durch Reg3 β ausschlaggebend (Closa, et al. 2007), da diese Transkriptionsfaktoren Promotion und Progression des CAC beeinflussen (Bollrath and Greten 2009). Bollrath et al. demonstrierten, dass die Persistenz prämaligener Zellen von einer STAT3-abhängigen Expression antiapoptotischer Proteine, wie Survivin, Bcl-x $_L$ und dem Chaperon Hsp70 abhängt. In Übereinstimmung damit bedingt die Ablation des STAT3-Inhibitors SOCS3 in intestinalen Epithelzellen auch eine erhöhte Tumorzinzidenz (Rigby, et al. 2007). NF κ B wirkt sich in diesem Zusammenhang über zwei Wege auf die Tumorpromotion aus: einerseits inhibiert es ähnlich wie STAT3 direkt die Apoptose intestinaler Epithelzellen (Eckmann, et al. 2008) und andererseits fördert es in myeloischen Zellen und T-Lymphozyten die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-11, welche wiederum selbst STAT3 aktivieren und hierüber dessen o.g. Wirkungen induzieren (Becker, et al. 2004). Weiterhin beeinflussen STAT3 und NF κ B die Transkription einer Reihe von Genen, welche die Epitheliale-Mesenchymale Transformation und Angiogenese, zwei wichtige Schritte in der Tumorphprogression, fördern (Bollrath and Greten 2009).

Über Reg3 β ist bekannt, dass es als Zielgen von STAT3 nach dessen Hyperaktivierung durch IL-6 und IL-11 in gp130^{Y757F}-Mäusen überexprimiert wird, nachdem in diesen Tieren ein CAC mittels AOM und DSS induziert wurde (Bollrath, et al. 2009). Gp130 ist eine transmembrane Untereinheit in Zytokinrezeptoren der IL-6-Familie und steuert die JAK-abhängige STAT3-Aktivierung. In gp130^{Y757F}-Mäusen führt eine Knock-In-Mutation in gp130 zu einem Versagen des negativen Feedbacks in dieser Signalkaskade und demzufolge zu einer Hyperaktivierung von STAT3 (Jenkins, et al. 2005). In AR42J-Zellen wurde gezeigt, dass in der Signalkaskade von Reg3 β STAT3 induziert wird, weswegen sich in diesem Zusammenhang ein positives Feedback nach Aktivierung des Reg3 β -Rezeptors ausbilden kann, welches durch JAK-Inhibition seitens SOCS3 wieder unterdrückt wird (Closa, et al. 2007). STAT3 und Reg3 β induzieren sich also gegenseitig, weswegen eine transgene Überexpression von Reg3 β deshalb auch zu einer übersteigerten STAT3-Aktivierung

in intestinalen Epithelzellen führen müsste und dementsprechend entweder über die sekundären Folgen dieses Transkriptionsfators oder primär eigene Funktionen eine antiapoptotische Wirkung im CAC ausüben könnte. Für eine direkte Inhibition des programmierten Zelltods sprechen hierbei die Befunde von Malka et al., nach welchen in pankreatischen Azinuszellen gezeigt werden konnte, dass Reg3 β die TNF α -induzierte Apoptose über den MEK1-ERK1/2-Signalweg hemmt (Malka, et al. 2000). In einer Studie an 27 Patienten mit SCC demonstrierten Cao et al., dass Reg3 β -positive Adenokarzinome in 87,5 % der Fälle eine größere S-Phase-Fraktion aufweisen (Cao, et al. 2009). Insofern Reg3 β hierbei tatsächlich selbst mitogen wirken sollte, wäre dieser Einfluss unabhängig von STAT3, da dieser Transkriptionsfaktor in der Pathogenese des SCC keine wesentliche Rolle spielt. Daneben ist bekannt, dass Reg3 β nicht nur durch STAT3, sondern auch durch den Transkriptionsfaktor Cdx1 induziert werden kann (Moucadel, et al. 2001). Dieses Homebox-Gen besitzt *in vitro* eine proonkogene Wirkung (Domon-Dell, et al. 2003), welche sich möglicherweise durch die proliferative Wirkung von Reg3 β erklären lässt. Daneben besitzt Reg3 β allerdings sowohl in myeloischen, als auch in intestinalen Epithelzellen eine inhibierende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor NF κ B (Gironella, et al. 2005), wodurch dessen Einfluss auf die Tumorigenese gehemmt werden müsste. Dies wiederum wirkt sich für das CAC eher antitumorigen aus, da NF κ B, wie weiter oben bereits erwähnt wurde, in intestinalen Zellen antiapoptotisch wirkt und zusätzlich die protumorigene Wirkung von STAT3 fördert. In Anbetracht dieser in Bezug auf die Colon-Karzinogenese ambivalenten Interaktionen, ist es deshalb denkbar, dass Reg3 β gleichermaßen pro- und antitumorigene Wirkungen im Verlauf eines CAC besitzt.

Zusammengefasst können die Ergebnisse aus dem transgenen Mausmodell die bislang postulierten Funktionen von Reg3 β in Bezug auf die Colitis und das CAC nicht bestätigen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass sich Reg3 β *in vivo* anders verhält als *in vitro* und sich somit die vorwiegend aus Zellkulturen gewonnenen Ergebnisse nicht auf das Mausmodell übertragen lassen. So ist in den pathologischen Szenarien der Colitis oder des CAC bisher lediglich eine vermehrte Expression dieses Isotyps der Reg-Familie beobachtet worden, ohne dass dabei dessen genauer Wirkmechanismus bekannt ist. Die Befunde von Gironella et al.

lassen diesbezüglich nur eingeschränkte Aussagen zu, da deren Ergebnisse auf *ex vivo* Studien basieren und die antiinflammatorische Wirkung von Reg3 β nur bei Morbus Crohn Patienten, nicht aber in Gruppe der Colitis Ulcerosa, beobachtet wurde (Gironella, et al. 2005). Möglicherweise ist Reg3 β in diesem Kontext lediglich als ein Biomarker ohne pathophysiologisch relevante Funktion anzusehen. Es gilt ferner als kritisch zu betrachten, dass die Ergebnisse dieser Arbeit auf der Charakterisierung nur einer Founderlinie basieren. Hieraus ergeben sich im Wesentlichen zwei relevante Störfaktoren. Zum einen ist es denkbar, dass die transgene Expression von Reg3 β in dieser Mauslinie nicht ausreichend hoch war, zum anderen könnte die randomisierte Integration der Vil-Reg3 β -Sequenz zu einer Beeinflussung des Phänotyps führen. Beide Szenarien sind allerdings als eher unwahrscheinlich anzusehen. Zwar wurden relativ hohe Standardabweichungen innerhalb der mRNA-Analysen für Reg3 β in der Grundcharakterisierung beobachtet, allerdings konnte mit dem sensitiven Immunblotverfahren eindeutig die vermehrte Expression in den Foundertieren nachgewiesen werden. Weiterhin ist sind mehr als 90 % des Mausgenoms sog. nicht-kodierende Junk-DNA, weshalb die Wahrscheinlichkeit einer Integration in einen kodierenden Abschnitt eher gering ist. In dieser Mauslinie war zudem in der Charakterisierung sowohl behandelte, als auch unbehandelte Tiere phänotypisch kein Unterschied zu sehen.

Die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der CED ist essentiell um das Verständnis über die pathogenetischen Abläufe zu verbessern und hierüber neue Ideen für zukünftige Behandlungsstrategien entwickeln zu können. Bislang basiert die konservative Therapie der CED auf der lokalen bzw. systemischen Anwendung mehrheitlich relativ unspezifisch wirkender Immunsuppressiva. Darunter finden sich im Wesentlichen Kortikosteroide und eine Reihe von Immunmodulatoren, wie Sulfasalazin, Azathioprin, Ciclosporin, Tacrolimus und Methotrexat. Da diese Substanzen mit eklatanten Nebenwirkungen einhergehen und deshalb in der Langzeitbehandlung wiederum das Risiko für Morbidität und Mortalität erhöhen, ist es wichtig, mit gezielteren Interventionen möglichst rasch eine v.a. steroidfreie Remission im akuten Schub zu erlangen. Konzepte für die Entwicklung spezifisch wirkender Substanzen basieren einerseits auf einer Interaktion mit entzündungsrelevanten Zytokinen und andererseits auf nicht-zytokinären Ansätzen. Die Angriffspunkte liegen dabei größtenteils auf einer Blockade der T-Zell-

Differenzierung bzw. –Aktivierung, weitere Ansätze sollen auf die Hemmung der Leukozytenrekrutierung abzielen oder die Reparaturkapazität der Mucosa verbessern (Atreya and Neurath 2008). Die meisten Medikamente befinden sich allerdings größtenteils noch in Phase I/II Studien und sind deshalb noch nicht praktisch erprobt. Klinisch kommen bisher die monoklonalen Antikörper Infliximab und Adalimumab zum Einsatz, welche sich gegen das Zytokin TNF α richten. Der genaue Wirkmechanismus der TNF α –Inhibition ist nicht gänzlich verstanden, allerdings spielt sehr wahrscheinlich die Induktion der Apoptose in pathologisch aktivierten T-Zellen eine entscheidende Rolle (Atreya and Neurath 2008). Obwohl die TNF α -Inhibitoren mit einem großen Risiko für Infektionen, insbesondere Tuberkulose und opportunistische Keime, assoziiert sind, erweisen sie sich dennoch als sehr effektiv bei der Induktion und Erhaltung der Remission von CED (Rutgeerts, et al. 2005; Schreiber, et al. 2007), wodurch einerseits Kortikosteroide eingespart und in Crohn Patienten sogar fistulierende Komplikationen geheilt werden können (Sands, et al. 2004). Bislang wird ein sogenanntes *step-up*-Schema verfolgt, in welchem TNF α -Inhibitoren erst nach Versagen der konventionellen Medikation bei therapierefraktären Patienten bzw. aggressiven Schüben angewandt werden. Da die Rezidivraten der CED nach erfolgreicher Remission leider immer noch relativ hoch sind (ca. 30 % innerhalb des ersten Jahres beim Morbus Crohn), setzt sich mittlerweile allerdings mehr und mehr das Konzept einer *step-down*-Therapie durch, in welcher bereits initial eine Kombination aus Immunmodulatoren und Infliximab zum Einsatz kommt. Gegenüber der konventionellen Therapie profitieren hiervon insbesondere solche Patienten, bei welchen ein Morbus Crohn erst neu diagnostiziert wurde (D'Haens, et al. 2008). Es erscheint unter diesen Gesichtspunkten deshalb als besonders entscheidend, bereits die Initiationsphase der Entzündung zu deeskalieren, weil hierdurch der epitheliale Schaden geringer gehalten wird und damit die Integrität der intestinalen Mucosa besser erhalten bleibt. Da sich das angeborene Immunsystem maßgeblich an der Initiation der CED beteiligt, müssen sich zukünftige Ansätze deshalb vor allem an diese Komponente der Abwehr richten. In Anbetracht dieses neueren Therapiekonzepts, sind die hypothetisierten Eigenschaften des C-Typ Lektins Reg3 β besonders vielversprechend, da hierbei potentiell gleichzeitig an zwei wesentlichen pathogenetischen Mechanismen einer CED angegriffen wird: zum einen in die gestörte Interaktion zwischen dem angeborenem Immunsystem und residierender

Darmflora und zum anderen in die Förderung der mucosalen Regeneration. Diese Arbeit hatte deshalb zum Ziel, das Verständnis über die Funktionen von Reg3 β zu verbessern und zu überprüfen, inwieweit sich die bisherigen Forschungsergebnisse in einem lebenden Organismus verifizieren lassen. Die vorhandenen Resultate bestätigen die bisherigen Beobachtungen über Reg3 β zwar nicht, allerdings besitzen sie aufgrund der noch nicht erfolgten Reproduktion in weiteren transgenen Mauslinien lediglich einen hinweisenden Charakter. Reg3 β bleibt deshalb weiterhin ein interessanter Kandidat, welchem man in der Grundlagenforschung mit Bezug zu CED Aufmerksamkeit schenken sollte.

6 Zusammenfassung

In Entzündungen und Tumoren des Gastrointestinaltrakts wird eine vermehrte Expression des C-Typ-Lektins Reg3 β beobachtet. Über dessen konkrete Funktionen im Kontext von Entzündung und Karzinogenese ist bislang allerdings noch wenig bekannt. In bisherigen *in vitro* Studien wird Reg3 β eine regenerative, antiinflammatorische und zum Teil auch antimikrobielle Funktion zugesprochen. Darüber hinaus sind Interaktionen mit tumorrelevanten Signalwegen bekannt. In dieser Arbeit wurde anhand der transgenen Mauslinie Tg(Vil-Reg3 β) untersucht, inwieweit Reg3 β einen Einfluss auf die intestinale Zellhomöostase, sowie die Pathogenese der akuten Colitis und des CAC ausübt. In unbehandelten Tieren zeigte die transgene Überexpression von Reg3 β hierbei keine Auswirkung auf die Proliferation oder Apoptose intestinaler Stammzellen. Die Histologie in Jejunum und Colon transgener Tiere war dementsprechend unauffällig. Des Weiteren wurde unter der Induktion einer akuten Colitis in transgenen Tieren kein Unterschied in Bezug auf die Ausprägung der Inflammation und des Epithelschadens festgestellt, weswegen die Hypothese einer regenerativen und antiinflammatorischen Wirkung nicht verifiziert werden konnte. Im Modell des CAC zeigte die Überexpression von Reg3 β keine Variation in Bezug auf die absolute Tumorzinzidenz und die Verteilung der Tumorfäche hinsichtlich Mikro- oder Makrotumore. Die jeweiligen neoplastischen Areale unterschieden sich hierbei nicht in der Anzahl mitotischer oder apoptotischer Zellen. Demnach imponierte Reg3 β in diesem Modell weder mit pro- noch antitumorigenen Effekten im Rahmen eines CAC.

Die Beobachtungen in der untersuchten Mauslinie Tg(Vil-Reg3 β) lassen insgesamt unerwarteterweise keinen Einfluss von Reg3 β auf Entzündung, Tumorigenese und die mucosale Regeneration im murinen Intestinum erkennen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit müssen die Aussagen aus bisherigen Forschungsarbeiten über Reg3 β bzw. deren Übertragbarkeit auf das Mausmodell somit kritisch hinterfragt werden. Zur Bestätigung der bisherigen Beobachtungen ist es allerdings weiterhin notwendig, die entsprechenden Versuche in weiteren transgenen Foundern für Reg3 β zu validieren.

7 Literaturverzeichnis

- Alonzi T, Newton IP, Bryce PJ, Di Carlo E, Lattanzio G, Tripodi M, Musiani P and Poli V. (2004) Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis. *Cytokine* 26(2):45-56.
- Atreya I, Atreya R, and Neurath MF. (2008) NF- κ B in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine* 263(6):591-596.
- Atreya R, and Neurath, MF. (2008) New therapeutic strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 1(3):175-82.
- Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chang CG, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Loehrs U and Waldman FM. (2002) The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* 94(5):1421-7.
- Balkwill F, and Mantovani A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357(9255):539-45.
- Beauchamp RD, Sheng HM, Shao JY, Thompson EA and Ko TC. (1996) Intestinal cell cycle regulations. Interactions of cyclin D1, Cdk4, and p21Cip1. *Ann Surg* 223(5):620-7; discussion 627-8.
- Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S and Neurath MF. (2004) TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21(4):491-501.
- Becker S, Quay J, Koren HS, Haskill JS. (1994) Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1):L278-86.
- Berg DJ, Davidson N, Kühn R, Müller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach MW, and Rennick D. (1996) Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 98(4):1010-20.
- Bernard-Perrone FR., Renaud WP, Guy-Crotte OM, Bernard P, Figarella CG, Okamoto H, Balas DC, and Senegas-Balas FO. (1999) Expression of REG protein during cell growth and differentiation of two human colon carcinoma cell lines. *J Histochem Cytochem* 47(7):863-70.
- Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. (1998) Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 188(10):1929-39.
- Bollrath J, and Greten FR. (2009) IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep* 10(12):1314-9.

- Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S, Matthews V, Schmid RM, Kirchner T, Arkan MC, Ernst M, Greten FR. (2009) gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 15(2):91-102.
- Bozza M, Bliss JL, Dorner AJ, Trepicchio WL. (2001) Interleukin-11 modulates Th1/Th2 cytokine production from activated CD4+ T cells. *J Interferon Cytokine Res* 21(1):21-30.
- Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Rubin CE, Stevens AC, Burmer GC. (1994) Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 107(2):369-78.
- Burger-van Paassen N, Loonen LM, Witte-Bouma J, Korteland-van Male AM, de Bruijn AC, van der Sluis M, Lu P, Van Goudoever JB, Wells JM, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB. (2012) Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3beta, Reg3gamma and angiogenin-4. *PLoS One* 7(6):e38798.
- Burmer GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Crispin DA, Brentnall TA, Kolli VR, Stevens AC and Rubin CE. (1992) Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* 103(5):1602-10.
- Cao G, Ma J, Zhang Y, Liu B and Li F. (2009) Pancreatitis-associated protein is related closely to neoplastic proliferative activity in patients with colorectal carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)* 292(2):249-53.
- Christa, L, Carnot F, Simon MT, Levavasseur F, Stinnakre MG, Lasserre C, Thepot D, Clement B, Devinoy E and Brechot C. (1996) HIP/PAP is an adhesive protein expressed in hepatocarcinoma, normal Paneth, and pancreatic cells. *Am J Physiol* 271(6 Pt 1):G993-1002.
- Clapper ML, Cooper HS, and Chang WC. (2007) Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin* 28(9):1450-9.
- Closa D, Motoo Y, and Iovanna YL. (2007) Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine. *World J Gastroenterol* 13(2):170-4.
- Cooks T, Pateras IS, Tarcic O, Solomon H, Schetter AJ, Wilder S, Lozano G, Pikarsky E, Forshev T, Rosenfeld N, Harpaz N, Itzkowitz S, Harris CC, Rotter V, Gorgoulis VG and Oren M. (2013) Mutant p53 Prolongs NF-kappaB Activation and Promotes Chronic Inflammation and Inflammation-Associated Colorectal Cancer. *Cancer Cell* 23(5):634-46.
- Cooper HS, Murthy SN, Shah RS and Sedergran DJ. (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 69(2):238-49.
- Cui W, De Jesus K, Zhao H, Takasawa S, Shi B, Srikant CB and Liu JL. (2009) Overexpression of Reg3alpha increases cell growth and the levels of cyclin D1 and CDK4 in insulinoma cells. *Growth Factors* 27(3):195-202.

- D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, De Vos M, van Deventer S, Stitt L, Donner A, Vermeire S, Van de Mierop FJ, Coche JC, van der Woude J, Ochsenkühn T, van Bodegraven AA, Van Hoogtegem PP, Lambrecht GL, Mana F, Rutgeerts P, Feagan BG and Hommes D. (2008) Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 371(9613):660-7.
- Diego, UC San. (Retrieved 21 February 2013) Pronuclear Injection.
- Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. (1998) Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 114(3):385-91.
- Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO.(1994) Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 107(6):1643-52.
- Domon-Dell C, Schneider A, Mouchadel V, Guerin E, Guenot D, Aguilon 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):7913-21.
- Dusetti NJ, Ortiz EM, Dagorn JC, Iovanna JL. (1995) Identification of a transcriptional regulatory region of the rat pancreatitis-associated protein I (PAP I) gene that confers tissue specificity. *Biochem J* 311 (Pt 2):643-7.
- Eaden JA, Abrams KR, and Mayberry JF. (2001) The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48(4):526-35.
- Eckmann L, Nebelsiek T, Fingerle AA, Dann SM, Mages J, Lang R, Robine S, Kagnoff MF, Schmid RM, Karin M, Arkan MC, Greten FR. (2008) Opposing functions of IKKbeta during acute and chronic intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39):15058-63.
- Ferrés-Masó M, Sacilotto N, López-Rodas G, Dagorn JC, Iovanna JL, Closa D, Folch-Puy E. (2009) PAP1 signaling involves MAPK signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(13):2195-2204.
- Fiocchi C, Jbattisto JR, and Farmer RG. (1981) Studies on isolated gut mucosal lymphocytes in inflammatory bowel disease. Detection of activated T cells and enhanced proliferation to *Staphylococcus aureus* and lipopolysaccharides. *Dig Dis Sci* 26(8):728-36.
- Folch-Puy E, Granell S, Dagorn JC, Iovanna JL, Closa D. (2006) Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. *J Immunol* 176(6):3774-9.
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. (1996) Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157(3):1261-70.

- Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach F. (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(1):G216-28.
- Gironella M, Folch-Puy E, LeGoffic A, Garcia S, Christa L, Smith A, Tebar L, Hunt SP, Bayne R, Smith AJ, Dagorn JC, Closa D, Iovanna JL. (2007) Experimental acute pancreatitis in PAP/HIP knock-out mice. *Gut* 56(8):1091-7.
- Gironella M, Iovanna JL, Sans M, Gil F, Peñalva M, Closa D, Miquel R, Piqué JM, Panés J. (2005) Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. *Gut* 54(9):1244-53.
- Gorelik L, and Flavell RA. (2000) Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12(2):171-81.
- Grady WM, and Carethers JM. (2008) Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135(4):1079-99.
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118(3):285-96.
- Gupta RA, and Dubois RN. (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1(1):11-21.
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. (2001) Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357(9272):1925-8.
- Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. (2002) Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 17(5):629-38.
- Hermiston ML, and Gordon JI. (1995) Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 270(5239):1203-7.
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambis S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC. (2000) Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 60(13):3333-7.
- Iida N, and Grotendorst GR. (1990) Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol Cell Biol* 10(10):5596-9.
- Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nuñez G. (2005) NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74:355-83.
- Jenkins BJ, Grail D, Nheu T, Najdovska M, Wang B, Waring P, Inglese M, McLoughlin RM, Jones SA, Topley N, Baumann H, Judd LM, Giraud AS, Boussioutas A, Zhu HJ, Ernst M. (2005) Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. *Nat Med* 11(8):845-52.

- Kanneganti M, Mino-Kenudson M, and Mizoguchi E. (2011) Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011:342637.
- Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Efstathiou J, Valizadeh A, Noda M, Playford RJ, Kmiot W, Pignatelli M. (1998) Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 185(4):413-8.
- Karin M, and Greten FR. (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5(10):749-59.
- Keim V, Rohr G, Stöckert HG, Haberich FJ. (1984) An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion* 29(4):242-9.
- Kett K, Rognum TO, and Brandtzaeg. P (1987) Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gastroenterology* 93(5):919-24.
- Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. (2000) Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118(6):1001-11.
- Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK. (1992) Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 103(3):840-7.
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75(2):263-74.
- Lakatos, PL, and Lakatos L (2008) Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol* 14(25):3937-47.
- Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nuñez G, Keshav S. (2003) Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125(1):47-57.
- Leach MW, Davidson NJ, Fort MM, Powrie F, Rennick DM. (1999) The role of IL-10 in inflammatory bowel disease: "of mice and men". *Toxicol Pathol* 27(1):123-33
- Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. (2000) Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289(5488):2350-4.
- Malizia G, Calabrese A, Cottone M, Raimondo M, Trejdosiewicz LK, Smart CJ, Oliva L, Pagliaro L. (1991) Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100(1):150-9.
- Malka D, Vasseur S, Bödeker H, Ortiz EM, Dusetti NJ, Verrando P, Dagorn JC, Iovanna JL. (2000) Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein 1 activation. *Gastroenterology* 119(3):816-28.
- Marz-Weiss P, Kunz D, Bimmler D, Berkemeier C, Özbek S, Dimitriades-Schmutz B, Haybaeck J, Otten U, Graf R. (2011) Expression of pancreatitis-associated protein after traumatic brain injury: a mechanism potentially contributing to neuroprotection in human brain. *Cell Mol Neurobiol* 31(8):1141-9.

- Matsuura T, West GA, Youngman KR, Klein JS, Fiocchi C. (1993) Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104(2):448-58
- Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Lizza F, Pallone F. (1997) Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 112(4):1169-78.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275(5307):1787-90.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96(3):795-803.
- Moser B, Clark-Lewis I, Zwahlen R, Baggiolini M. (1990) Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J Exp Med* 171(5):1797-802.
- Motoo Y, Itoh T, Su SB, Nakatani MT, Watanabe H, Okai T, Sawabu N. (1998) Expression of pancreatitis-associated protein (PAP) mRNA in gastrointestinal cancers. *Int J Pancreatol* 23(1):11-6.
- Moucadel V, Soubeyran P, Vasseur S, Duseti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL. (2001) Cdx1 promotes cellular growth of epithelial intestinal cells through induction of the secretory protein PAP I. *Eur J Cell Biol* 80(2):156-63.
- Narushima Y, Unno M, Nakagawara K, Mori M, Miyashita H, Suzuki Y, Noguchi N, Takasawa S, Kumagai T, Yonekura H, Okamoto H. (1997) Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma. *Gene* 185(2):159-68.
- Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. (1995) Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182(5):1281-90.
- Okamoto H. (1999) The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6(3):254-62.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3):694-702.
- Orlichenko LS, Behari J, Yeh TH, Liu S, Stolz DB, Saluja AK, Singh VP. (2010) Transcriptional regulation of CXC-ELR chemokines KC and MIP-2 in mouse pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(4):G867-76.
- Panwala CM, Jones JC, Viney JL. (1998) A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 161(10):5733-44.
- Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L, Mathew CG. (2007) Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple

- other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 39(7):830-2.
- Perdue MH. (1999) Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1):G1-5.
- Perse M and Cerar A. (2012) Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012:718617.
- Potack J and Itzkowitz SH. (2008) Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut Liver* 2(2):61-73.
- Rennick DM, Fort MM, and Davidson NJ. (1997) Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview. *J Leukoc Biol* 61(4):389-96.
- Rigby RJ, Simmons JG, Greenhalgh CJ, Alexander WS, Lund PK. (2007) Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. *Oncogene* 26(33):4833-41.
- Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. (2002) Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 62(6):1868-75.
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. (2005) Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 353(23):2462-76.
- Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, Williams C, Price A, Talbot I, Forbes A. (2004) Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 126(2):451-9.
- Salmi M, Granfors K, MacDermott R, Jalkanen S. (1994) Aberrant binding of lamina propria lymphocytes to vascular endothelium in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 106(3):596-605.
- Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. (2004) Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 350(9):876-85.
- Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. (1990) A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 86(2):202-10.
- Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. (1999) Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116(2):301-9.
- Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OØ, Hanauer SB, McColm J, Bloomfield R, Sandborn WJ; PRECISE 2 Study Investigators. (2007)

- Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med* 357(3):239-50.
- Schumacher C, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. (1992) High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21):10542-6.
- Schwitalla S, Ziegler PK, Horst D, Becker V, Kerle I, Begus-Nahrman Y, Lechel A, Rudolph KL, Langer R, Slotta-Huspenina J, Bader FG, Prazeres da Costa O, Neurath MF, Meining A, Kirchner T, Greten FR. (2013) Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors. *Cancer Cell* 23(1):93-106.
- Simon MT, Pauloin A, Normand G, Lieu HT, Mouly H, Pivert G, Carnot F, Tralhao JG, Brechot C, Christa L. (2003) HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway. *FASEB J* 17(11):1441-50.
- Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ, Anderson GR. (1999) The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26):15121-6.
- Strober W, Kelsall B, and Marth T. (1998) Oral tolerance. *J Clin Immunol* 18(1):1-30.
- Subramanian V, Meyer B, and Evans GS. (1998) The murine Cdx1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* 64(1):11-8.
- Sugimoto K. (2008) Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14(33):5110-4.
- Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RK, Xavier RJ, and Mizoguchi A. (2008) IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 118(2):534-44.
- Takahashi M, and Wakabayashi K. (2004) Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci* 95(6):475-80.
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S. (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10(1):39-49.
- Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138(6):2101-2114 e5.
- Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhães JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nuñez G, Girardin SE, Philpott DJ. (2010) Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 11(1):55-62.
- Trichopoulos D. (1999) Infections and human cancer: cancer surveys, volume 33; microbes and malignancy: infection as a cause of human cancers. *BMJ* 319(7218):1207.

- Ullman TA, and Itzkowitz SH. (2011) Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 140(6):1807-16.
- van Ampting MT, Loonen LM, Schonewille AJ, Konings I, Vink C, Iovanna J, Chamailard M, Dekker J, van der Meer R, Wells JM, Bovee-Oudenhoven IM. (2012) Intestinally secreted C-type lectin Reg3b attenuates salmonellosis but not listeriosis in mice. *Infect Immun* 80(3):1115-20.
- Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, Garcia S, Fiedler F, Lerch MM, Dagorn JC, Cloasa D, Iovanna JL. (2004) p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. *J Biol Chem* 279(8):7199-207.
- Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2(3):541-6.
- Wirtz S and Neurath MF. (2007) Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 59(11):1073-83.
- Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. (1989) Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(2):612-6.
- Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, Waldhöer T, Lochs H. (1993) Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 341(8858):1437-9.
- Xavier RJ, and Podolsky DK. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448(7152):427-34.
- Zhang W, Chen Y, Wei H, Zheng C, Sun R, Zhang J, Tian Z. (2008) Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 14(20):6432-9.

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Florian Greten für die umfassende Betreuung und Begleitung im Rahmen dieses Projektes bedanken. Das kritische Hinterfragen, die wertvollen Hinweise und die kontinuierliche Motivation haben mich dazu gebracht, über meine Grenzen hinaus zu denken. Vielen Dank für die Geduld und Mühen.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitgliedern aus der Arbeitsgruppe: Julia Bollrath, Charles Pallangyo, Özge Canli, Arun Kumar Mankan, Paul Ziegler, Kristin Retzlaff und Kerstin Burmeister. Besonders hervorzuheben sind hierbei Tiago de Oliveira, Sarah Schwitalla und Michaela Alexandra Diamanti. Ich danke euch für euer Mitwirken.

Besonderer Dank gebührt meiner gesamten Familie, insbesondere meinen Eltern Wilfried und Karin Willert. Eure Liebe und Fürsorge sind fortwährend die Basis für das Erreichen meiner Ziele.