

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Horst Lorenz Fehm

**Expressionsanalyse von Calprotectin und humanen α - und β -
Defensinen in der kolorektalen Karzinogenese**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -
vorgelegt von
Kim Barbara Luley
aus Lübeck

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Nils Homann

2. Berichterstatter/-in: Prof. Dr.med. Rainer Broll

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2005

Zum Druck genehmigt Lübeck, den 21.12.2005

Meiner Familie in großer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	5
1.1	Epidemiologie und klinischer Verlauf des kolorektalen Karzinoms	5
1.2	Früherkennung	7
1.2.1	Okkultes Blut im Stuhl - „fäkales okkultes Blut – Test“ (FOBT)	8
1.2.2	Koloskopie und Polypektomie	8
1.2.3	Tumormarker	9
1.2.3.1	Carcinoembryonales Antigen (CEA)	9
1.2.3.2	Weitere Tumorassoziierte Marker	9
1.2.3.3	C-reaktives Protein (CRP)	10
1.2.3.4	Calprotektin	10
1.3	Ätiologie und Pathogenese	11
1.4	Assoziation von Entzündung und Kolorektalkarzinogenese	14
1.4.1	Defensine	16
1.5	Fragestellungen	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Geräte und Material	18
2.1.1.	Geräte	18
2.1.2.	Materialien	20
2.1.2.1	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2.2	Chemikalien	21
2.1.2.3	Puffer und Stammlösungen	24
2.1.2.4	Kommerzielle Kits und Anitkörper	24
2.1.2.5	Primer	26

2.1.3	Untersuchungsmaterialien	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Immunhistochemie	28
2.2.1.1	APAAP	29
2.2.1.2	Indirekte Immunperoxidasefärbung	31
2.2.2	RT-PCR	33
2.2.2.1	RNA-Isolation	33
2.2.2.2	Reverse Transkription	34
2.2.2.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	35
2.2.2.4	Agarose-Gel-Elektrophorese	35
2.2.3	Real- time RT-PCR	36
2.2.4	<i>Limulus Amöbozyten Lysat (LAL-)</i> Test	37
2.2.5	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α)	38
2.2.6	Calprotektin	39
2.2.6.1	Calprotektinbestimmung	40
2.2.6.2	Gesamt-Proteinbestimmung	
2.2.6.2	Immunhistochemische Färbung von Calprotektin	40
2.2.7	C-reaktives Protein (CRP), Carcinoembryonales Antigen (CEA), Albumin und Procalcitonin	41
2.2.8	Statistische Methoden	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	Defensine	43
3.1.1	Immunhistochemische Untersuchung auf Defensine	43
3.1.1.1	HBD-1	44
3.1.1.2	HBD-2	45
3.1.1.3	HD5	46
3.1.2	Expression von Defensin-mRNA mittels qualitativer RT-PCR	48

3.1.3	Expression von Defensin-mRNA mittels quantitativer Real-Time RT-PCR Analyse	49
3.2	Calprotektin	53
3.2.1	Bestimmung der Calprotektin-Proteinkonzentration in Serum und Gewebe mittels ELISA	54
3.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von Calprotektin im Gewebe und die Assoziation zur Granulozyteninfiltration	56
3.3	Entzündungsmarker	60
3.3.1	<i>Limulus Amöbozyten Lysat Test (LAL Test)</i>	60
3.3.2	Procalcitonin (PCT)	60
3.3.3	C-reaktives Protein (CRP)	61
3.4	Weitere im Serum zu messende Parameter (TNF- α und Albumin)	62
3.4.1	Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	62
3.4.2	Albumin	63
3.5	Tumormarker	64
3.5.1	Carcinoembryonales Antigen (CEA)	64
4	Diskussion	66
4.1	Defensine	68
4.2	Calprotektin	71
4.3	Sonstige Marker	75
4.3.1	<i>Limulus Amöbozyten Lysat (LAL)-Test</i>	75
4.3.2	Procalcitonin	76
4.3.3	C-reaktives Protein (CRP)	76
4.3.4	Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	78
4.3.6	Carcinoembryonales Antigen (CEA)	79
4.4	Schlussfolgerung	80

5	Zusammenfassung	82
6	Abkürzungen	84
7	Literaturverzeichnis	88
8	Danksagung	98
9	Lebenslauf	100

1 Einleitung

1.2 Epidemiologie und klinischer Verlauf des kolorektalen Karzinoms

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) ist in Europa in den letzten 20 Jahren auf ca. 25 pro 100.000 Einwohner pro Jahr angestiegen. Mit jährlich 57.000 Neuerkrankungen stellt das kolorektale Karzinom (KRK) in Deutschland bei Männern die dritthäufigste, bei Frauen die zweithäufigste Krebsneuerkrankung dar (Schmiegel 2002). Ein Drittel der Karzinome ist im Rektumbereich lokalisiert, etwa zwei Drittel im Kolon.

Auch in der Tumorbedingten Mortalitätsstatistik steht das KRK bei Frauen hinter dem Mammakarzinom an zweiter Stelle, bei Männern hinter Bronchial- und Prostatakarzinom an dritter Stelle (Statistisches Bundesamt 2000). Männer und Frauen sind ungefähr gleich häufig betroffen. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Im Jahr 2002 starben laut Statistischem Bundesamt 20363 Menschen in Deutschland an den Folgen bösartiger Neubildungen des Dickdarms. Der steigenden Häufigkeit steht jedoch eine in den letzten Jahren abnehmende Mortalitätsrate durch verbesserte Frühdiagnostik und Therapie gegenüber. Das Risiko, im Laufe des Lebens an einem KRK zu erkranken, liegt insgesamt bei ca. 5%, daran zu sterben bei ca. 3% (Steward 2003). Das kolorektale Karzinom ist eines der wenigen Karzinomleiden, bei dem in den letzten Jahren trotz steigender Inzidenz eine Abnahme der Mortalitätsrate zu verzeichnen ist (Jemal 2004).

Es gibt einige Kriterien, die die Prognose unabhängig von dem Stadium der Erkrankung einschränken. Hierzu gehören ein Alter bei Diagnosestellung von unter 40 Jahren, männliches Geschlecht und eine Tumorlokalisation im Kolon sigmoideum. Im Wesentlichen wird die Prognose aber durch die Progression, also das Stadium der Erkrankung bestimmt. Seit über 70 Jahren bemüht man sich daher um eine einheitliche Klassifikation der Stadien des KRK (Carreras 1992). An Stelle der seit 1932 verwendeten Dukes-Einteilung steht heute die Stadieneinteilung der

Union International Contre le Cancer (UICC). Sie basiert auf dem TNM-System, welches die Infiltration des Karzinoms in die Darmwand und seine Ausdehnung in benachbarte Strukturen, das Ausmaß des Lymphknotenbefalls und das Auftreten von Fernmetastasen berücksichtigt. T steht für die Ausdehnung des Primärtumors, von Stadium T0 ohne Anhalt für einen Primärtumor, bis zum Stadium T4, bei welchem der Tumor das viszerale Peritoneum perforiert, bzw. direkt andere Organe infiltriert hat. Tis steht für ein Carcinoma *in situ*. Mit N wird der Lymphknotenbefall beschrieben, bei N0 konnten keine Metastasen, bei N1 in 1- 3, bei N2 in ≥ 4 perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten Metastasen gefunden werden. Ein Lymphknotenbefall entlang der Mesenterialgefäße wird mit N3 beschrieben. Fernmetastasen werden mit M1 bezeichnet. Die aktuelle UICC-Stadieneinteilung stammt aus dem Jahr 2002.

UICC-Stadium	T	N	M	DUKES
0	Tis	N0	M0	
I	T1, T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4	N0	M0	B
IIIA	T1, T2	N1	M0	C
IIIB	T3, T4	N1	M0	C
IIIC	jedes T	N2	M0	C
IV	jedes T	jedes N	M1	D

Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach Dukes und UICC

Nicht zuletzt wegen unzureichender Vorsorge wird das KRK meist erst spät erkannt. Daher ist bei bis zu 60% der Patienten bei Erstdiagnose bereits ein UICC-Stadium III oder IV erreicht. Ab dem Stadium III liegen Lymphknotenmetastasen vor, im Stadium IV handelt sich um ein fernmetastasiertes Krebsleiden. Typischerweise werden Metastasen in den regionalen Lymphknoten, Leber und Lunge gefunden. 15 - 25% der Patienten weisen bei Feststellung des Primärtumors schon Lebermetastasen auf und weitere 20% entwickeln solche im Laufe der Behandlung ihres KRK (Pasetto 2003).

Für ein im Stadium I diagnostiziertes Krebsleiden ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 90 - 95% für den Patienten eine günstige Prognose gegeben, bei einem im Stadium IV diagnostizierten Karzinom ist nur noch mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 10% zu rechnen. Die Therapie ist primär operativ. Eine kurative Operation ist in fortgeschrittenen Stadien nur noch eingeschränkt möglich. Hieraus ergibt sich unter anderem die schlechte Prognose für diese Patienten. Wird das Tumorleiden rechtzeitig erkannt gehört es zu den neoplastischen Erkrankungen mit den besten Heilungschancen.

1.2 Früherkennung

Patienten mit einem KRK haben häufig lange Zeit keinerlei Symptome. Lagebedingt werden rechtsseitige Tumore besonders spät klinisch auffällig. So bleiben viele Tumore zunächst unerkannt und führen den Patienten erst zum Arzt, wenn beispielsweise stenosebedingte Probleme oder eine B-Symptomatik auftreten. Bedenkt man, wie sehr die Prognose eines Menschen mit einem KRK von dem Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängt, wird deutlich, welche Rolle der Früherkennung zukommt. Daher wurden in vielen Ländern Programme zur Früherkennung von kolorektalen Karzinomen ins Leben gerufen. Seit einiger Zeit ist die präventive Koloskopie zur Früherkennung auch in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland aufgenommen.

Die einfachste und billigste, aber leider häufig vernachlässigte Methode ist die digitale Untersuchung des Rektums. Rund die Hälfte aller Rektumkarzinome können so getastet werden. Eine Darmspiegelung, die den Goldstandard in der Diagnostik darstellt, wird von der Seite der Patienten oft mit Vorbehalt betrachtet und aus Angst vor Unannehmlichkeiten vermieden. Die hohe Akzeptanz des Tests auf okkultes Blut im Stuhl zeigt, wie wichtig einfach zu handhabende Vorsorgeuntersuchungen sind.

1.2.2 Okkultes Blut im Stuhl - „fäkales okkultes Blut – Test“ (FOBT)

Kolorektale Polypen und Karzinome neigen dazu, intermittierend zu bluten. Seit 1977 ist daher der Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT) als Früherkennungsuntersuchung beim KRK in Deutschland von den gesetzlichen Krankenkassen zugelassen.

Der jährliche FOBT ab dem 50. Lebensjahr ist nach wie vor trotz geringer Spezifität und Sensitivität vor allem wegen seiner Praktikabilität und der hohen Akzeptanz von Seiten der Patienten eine häufig gewählte Methode der Früherkennung. Bei regelmäßiger Testdurchführung kann eine Senkung der KRK-Mortalität um 23% erreicht werden (Towler1998).

1.2.3 Koloskopie und Polypektomie

In Deutschland übernehmen die Krankenkassen im Rahmen des Krebsvorsorgeprogramms ab dem 50. Lebensjahr eine jährliche Untersuchung auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT) oder wahlweise ab dem 56. Lebensjahr eine Koloskopie, die innerhalb von 10 Jahren wiederholt werden kann. Die reine Sigmoidoskopie als Screening-Verfahren führt zu einer Senkung der Mortalität der KRK des Rektosigmoids um etwa 60 bis 80% (Newcomb 1992). Eine komplette Koloskopie ist der Sigmoidoskopie allerdings noch überlegen. Sie besitzt die höchste Sensitivität zur Erkennung tumorös veränderter kolorektaler Schleimhaut. Sie ist zudem das einzige Verfahren, das die Möglichkeit der endoskopischen Abtragung präneoplastischer Läsionen im gesamten Kolon bietet (Winawer 1993).

Werden bei der Endoskopie Polypen entdeckt, sollten sie bei einer Größe über 5 mm durch eine Polypektomie entfernt werden. Polypen unter 5 mm sollten mit der Zange komplett entfernt werden. Studien zeigen, dass durch Polypektomie die Inzidenz für KRK um 75 bis 90% reduziert werden kann (Vogt 2002).

Im Rahmen der National Polyp Study konnten Adenomgröße und Histologie der Polypen als unabhängige Risikofaktoren bestätigt werden (O'Brien 1990).

1.2.4 Tumormarker

Neben dem Test auf okkultes Blut und der Endoskopie existieren eine Vielzahl weiterer tumorassoziierter Marker für das kolorektale Karzinom, die sowohl im Blut als auch im Stuhl nachweisbar sind. Tumormarker sind für Verlauf und Nachsorge maligner Erkrankungen, weniger für ihre Diagnose von Bedeutung.

1.2.3.1 Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) ist für das KRK ein etablierter Tumormarker. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Serumkonzentration und der absoluten Tumormasse. Werte über 50 ng/ml sprechen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine Metastasierung, bei kleineren Tumoren sind hingegen häufig Normwerte zu messen (Ruf 2000).

1.2.3.2 Weitere Tumorassoziierte Marker

Neben dem bei Patienten mit einem KRK routinemäßig gemessenen CEA gibt es zahlreiche weitere Blutwerte, die im Rahmen dieser malignen Erkrankung erhöht sein können. Beispiele stellen das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9), das Cancer-Antigen 125 (CA-125) und das Tissue Polypeptide Antigen (TPA) dar. Sie haben aber aufgrund ihrer geringen Spezifität für das KRK einen sehr viel geringeren Stellenwert. Der Tissue Factor (TF) gehört zu den Markern für das KRK, die zurzeit hauptsächlich im Rahmen von Studien bestimmt werden.

1.2.3.3 C-reaktives Protein (CRP)

Das C-reaktive Protein (CRP) gilt als klassischer Vertreter der Akut-Phase-Proteine. Es wurde erstmals 1930 als Präzipitin für das C-Polysaccharid von Pneumokokken beschrieben. Es stellt einen der primitivsten Abwehrmechanismen des Menschen dar. Seine biologischen Eigenschaften und Funktionen sind in ihren Einzelheiten meist noch unbekannt.

CRP kann im Rahmen von Entzündungsprozessen um mehr als Faktor den 100 ansteigen. Es ist seit langem bekannt, dass es auch im Rahmen von malignen Prozessen, vor allem bei fortgeschrittener Erkrankung, oft zu einem Anstieg des Proteins im Blut kommt. Erlinger *et al.* veröffentlichten kürzlich eine Studie, die zeigte, dass bei Patienten mit einem Kolonkarzinom eine signifikante Erhöhung des Plasma-CRP im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv bereits vor der Diagnosestellung des Karzinoms nachzuweisen ist (Erlinger 2004). Das CRP gilt somit als ein unspezifischer Marker, der sowohl bei Entzündungen als auch bei Malignomen erhöht ist.

1.2.3.4 Calprotektin

Bei Calprotektin handelt es sich um einen mit Entzündungen assoziierten Heterodimer-Komplex aus einem Zink-bindenden und zwei Kalzium-bindenden Proteinen (S100A8/ S100A9) mit antimikrobiellen Eigenschaften. In der Gastroenterologie hat sich die Messung des fäkalen Calprotektins insbesondere bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) etabliert (Poullis 2003). Zahlreiche andere entzündliche Vorgänge, aber auch Karzinomleiden, können zu erhöhten Werten führen. Seine Rolle bei der Krebsfrüherkennung ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Einige Daten sprechen für einen möglichen Einsatz in diesem Bereich. So konnten Kristinsson *et al.* 1998 ein erhöhtes Calprotektin in der Mehrzahl der Fälle im Stuhl von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachweisen (Kristinsson 1998). In ihrer Studie konnten sie zudem einen signifikant geringeren Plasmacalprotektin Gehalt bei KKK-Patienten im Stadium T1 und T2 als bei fortgeschritteneren Stadien zeigen. In einer neueren

Studie war der prädiktive Wert von Calprotektin als Tumormarker jedoch sehr begrenzt. Im letzten Jahr wurde eine Arbeit von Hoff *et al.* veröffentlicht, die den Test auf fäkales Calprotektin nicht als verwertbaren Screeningtest ausweist (Hoff 2004).

Wie das CRP gilt fäkales Calprotektin somit als ein eher unspezifischer Marker sowohl für Entzündungen als auch für Malignome. Warum Calprotektin allerdings auch bei Malignomen in deutlich erhöhten Spiegel im Stuhl nachweisbar ist, ist bis heute noch unverstanden. So ist nicht bekannt, ob die erhöhten Calprotektin-Spiegel Folge einer eher vermehrten Exkretion über eine durchlässigere Schleimhaut („leaky gut“) oder Folge einer vermehrten Produktion in der Schleimhaut ist. Auch sind Expressionsort und Spezifität der Expression bei Malignomen noch nicht untersucht. Insbesondere ist die Frage, ob Calprotektin tatsächlich vermehrt nur in den neoplastischen Geweben gebildet wird, bis jetzt ungeklärt.

1.3 Ätiologie und Pathogenese des KRK

Zu den Risikofaktoren des sporadischen KRK zählen spezielle Ernährungsgewohnheiten. Hierunter fallen hoher Verzehr von rotem Fleisch, tierischen Fetten sowie Gemüse- und Kalziumarme Kost. Langjähriger Nikotin- und Alkoholabusus sowie Adipositas und Bewegungsmangel werden ebenfalls zu den prädisponierenden Faktoren gezählt (Slattery 1988). Lange Zeit ging man davon aus, dass faserreiche Ernährung bei der Entstehung des Dickdarmkrebses protektiv wirkt. Neuere Studien stellen diese These allerdings in Frage (Fuchs 1999; Alberts 2000).

Eine Folsäuresubstitution von mehr als 400 µg/Tag scheint präventiv zu sein. Es werden ein ebenfalls positiver Einfluss von Schwangerschaft in jungen Jahren und die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva diskutiert. In den letzten Jahren wurden Studien durchgeführt, die zeigen konnten, dass nicht-steroidale Antirheumatika eine präventive Wirkung auf die Entstehung des KRK haben. Cyclooxygenase-2 (COX-2), ein zentrales Enzym im Arachidonsäurestoffwechsel und bei der

Prostaglandinsynthese, scheint für den zugrunde liegenden Mechanismus von besonderer Bedeutung zu sein (Courtney 2004).

Die genannten Faktoren sind durch Lebensgewohnheiten bedingt und damit beeinflussbar. Von diesen abgrenzbar sind die für den Einzelnen nicht beeinflussbaren Faktoren. Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Primär sind dabei genetische Ursachen zu nennen. So steigt das Risiko, an einem KRK zu erkranken, mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad, Alter des Verwandten zum Diagnosezeitpunkt und der Anzahl der betroffenen Verwandten mit KRK deutlich an.

Ungefähr 10% aller KRK entstehen durch eine vererbte genetische Schädigung. Hierzu gehört die autosomal-dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP). Eine Neumutation ist für ca. 25% der Erkrankungen verantwortlich. Mit einer Häufigkeit von 1:10000 Einwohnern und einem Anteil von 1% an allen KRK ist es eine relativ seltene Erkrankung. Das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPPC), auch Lynch-Syndrom genannt, stellt mit 5 - 10% der KRK die häufigste Entität der autosomal-dominant vererbten Dickdarmkrebserkrankungen dar. Beim HNPPC liegt das mittlere Alter bei Diagnosestellung bei 45 Jahren. Es ist von einer Penetranz von 80% bis zum 75. Lebensjahr auszugehen.

Die Aufklärung dieser genetischen Faktoren hat viel zu unserem pathogenetischen Verständnis des KRK beigetragen. So findet man bei der FAP regelhaft eine Mutation des adenomatösen Polyposis-coli Gens (APC-Gen), welches auf dem Chromosom 5q21 liegt. Die Mutation führt um das 20. Lebensjahr zur Bildung von oft über 100 Polypen im Kolon. Es kommt obligat zur Bildung eines Kolonkarzinoms, was die Bedeutung dieses Gens in der Genese des KRK unterstreicht.

Genetische Grundlage des HNPPC sind Mutationen in so genannten Mismatch-Reparaturgenen, wie beispielsweise MSH-2, MSH-6, MLH-1 und PMS1/2. Diese genetischen Schäden führen zu einer Mikrosatelliteninstabilität (ca. 80 - 90% bei HNPPC vs. ca. 10% beim sporadischen KRK) (Kullmann 1996). Die sporadischen KRK entstehen meist auf der Basis eines adenomatösen Polypen. Die

Wahrscheinlichkeit der Entartung steigt mit der Polypengröße (ca. 2% bei einem Durchmesser < 1,5cm, bis zu 10% bei $\leq 2,5$ cm, über 10% bei einem Durchmesser > 2,5 cm). Vogelstein *et al.* stellten eine wichtige Arbeit über die molekularpathologischen Zusammenhänge des Dickdarmadenoms und -karzinoms vor (Fearon 1990). Es kommt hiernach durch sukzessive Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Progression eines Adenoms zu einem Karzinom. Bei dieser so genannten Multistep-Karzinogenese sind mindestens drei Tumorsuppressorgene (p53, DCC und APC) sowie ein dominantes Onkogen (c-K-ras) beteiligt, wobei ihre Mutationen vermutlich ohne feste Reihenfolge auftreten können (Fearon 1990).

Neben den genetischen Faktoren, die für ein KRK prädisponieren und den o.g. Faktoren für ein sporadisches KRK mit der sukzessiven Anhäufung von genetischen Schäden, gibt es schon seit langer Zeit zunehmende Evidenz dafür, dass auch Entzündungsprozesse an der Entstehung eines KRK beteiligt sind. Dies soll im folgenden Kapitel genauer erläutert werden.

1.4 Assoziation von Entzündung und Kolorektalkarzinogenese

Die Erkenntnis über eine Verbindung zwischen Entzündung und Tumorentstehung ist nicht neu. Schon Virchow postulierte diesen Zusammenhang bereits im Jahr 1863. Mittlerweile ist für zahlreiche Karzinomleiden ein Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen gesichert. So ist beispielsweise für das Leberzell-, Pankreas-, Gallenblasen, Harnblasen- und Zervixkarzinom gesichert, dass eine chronisch Entzündung in diesen Organen mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert ist (Welton 1979). Für das Magenkarzinom stellt in diesem Kontext die Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori* als Karzinogen einen der wichtigsten Meilensteine der letzten Jahre zum Verständnis der Infektassoziierten Karzinogenese dar.

In Hinblick auf die Rolle von Entzündungen und Bakterien in der Pathogenese des KRK lieferten Swidsinski *et al.* 1998 einen weiteren wichtigen Hinweis (Swidsinski 1998). Sie konnten eine Kolonisierung intrazellulärer *E. coli* in Darmbiopsien von Adenom- und Karzinompatienten im Gegensatz zu Kontrollpatienten nachweisen. Auch wenn der kausale Zusammenhang dieser Beobachtung letztlich noch unklar ist, wurde hier erstmals eine Assoziation zwischen Bakterienbesiedlung, Entzündung und maligner Entartung für das kolorektale Karzinom beschrieben.

Besonders offensichtlich ist der Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und kolorektaler Karzinogenese bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.

So ist bei Patienten mit Colitis ulcerosa das kolorektale Karzinomrisiko im Vergleich zur Normalpopulation deutlich erhöht (Gilat 1988; Gyde 1988). Die exakte Quantifizierung des kolorektalen Karzinomrisikos bei diesen Patienten wird durch die Heterogenität der Studiendesigns, die Variabilität der Kolektomiezeiten und den Wandel in der konservativen Therapie erschwert. Die Mehrzahl der Studien legt aber ein erhöhtes Risiko nahe. Die Prävalenz des kolorektalen Karzinoms bei Colitis-ulcerosa-Patienten liegt nach Daten einer Metaanalyse, die sich auf 116 Studien stützt, bei 3,7 % (Eaden 2001). Nach einer Erkrankungsdauer von 10 Jahren

liegt nach dieser Analyse die kolorektale Karzinominzidenzrate bei 2,1%, nach einer Erkrankungsdauer von 20 Jahren bei 8,5% und nach 30 Jahren bei 17,8% (Soetikno 2002).

Einen weiteren wichtigen Risikofaktor stellt die Ausdehnung der Colitis ulcerosa dar. Bei einer reinen Proktitis ist das Risiko nur um den Faktor 1,7, bei der linksseitigen Colitis um den Faktor 2,8 und bei ausgedehnten Colitis ulcerosa um den Faktor 14,8 erhöht (Ekbohm 1990; Gyde 1988). Die „Back-wash-Ileitis“ scheint ebenfalls ein erhöhtes Karzinomrisiko in sich zu bergen (Heuschen 1997). Auch das Ausmaß der Entzündungsaktivität scheint einen Einfluss auf das Entartungsrisiko zu haben (Gilat 1988; Gyde 1988; Ekbohm 1990; Rutter 2004; Sugita 1991). Die Morphologie der „Colitiskarzinome“ unterscheidet sich allerdings von der der sporadischen KKR. So sind sie eher in gering verdickter Schleimhaut plaqueartig wachsend.

Das Risiko, ein KKR zu entwickeln, ist bei Patienten mit einem Morbus Crohn wesentlich geringer im Vergleich zu Patienten mit Colitis ulcerosa. Auch wenn die Datenlage hierzu weniger eindeutig ist, so ist übereinstimmend bei ca. 0,4 - 0,8% der an einem Morbus Crohn leidenden Patienten mit einem KKR zu rechnen (Bansal 1996).

Der pathogenetische Prozess, der bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu einem erhöhten Krebsrisiko führt, ist noch wenig verstanden. Unter der Berücksichtigung der bereits erwähnten Arbeit von Swidsinski, die eine vermehrte mukosale Invasion von Bakterien bei Tumorpatienten erstmals belegen konnte, sind Mechanismen der mukosalen Infektabwehr in den Mittelpunkt der gegenwärtigen Forschung gerückt. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Defensine von großem Interesse (Swidsinski 1998).

1.4.1 Defensine

Die humanen Defensine sind antimikrobielle Peptide und bilden einen wichtigen Bestandteil der unspezifischen Abwehr. In der großen und weiterhin wachsenden Gruppe antimikrobieller Peptide bilden die Defensine eine Familie.

Vor allem im Rahmen des Morbus Crohn hat die Erforschung der humanen Defensine für ein neues Verständnis dieser Erkrankung gesorgt (Fellermann 2003). Arbeiten unserer eigenen Gruppe (Wehkamp 2002) untersuchten die Expression von β -Defensinen (HBD) bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). HBD-1 wurde in allen CED-Patientengruppen in der Ileumschleimhaut vergleichbar häufig nachgewiesen. In der entzündeten Mukosa zeigte sich eine Reduktion. Eine Expression von HBD-2 wurde bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen signifikant häufiger nachgewiesen als bei nicht Kontrollpatienten ohne entzündliche Darmerkrankung. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa war signifikant häufiger HBD-2-mRNA nachweisbar als bei Patienten mit Morbus Crohn.

Vor kurzem wurde schließlich auch HBD-3-Expression im Kolonepithel nachgewiesen. Das Expressionsmuster von HBD-3 bei CED gleicht dem von HBD-2. Auch HBD-3 war vorwiegend bei Patienten mit Colitis ulcerosa erhöht, nicht aber bei Patienten mit Morbus Crohn (Wehkamp 2003). Das humane α -Defensin-5 (HD-5) kommt vor allen in den Panethzellen des Ileums vor.

Völlig unklar ist noch, ob eine veränderte Expression der Defensine eventuell auch in der Kolorektalkarzinogenese zu beobachten ist. Dies ist insbesondere im Kontext der erwähnten Interaktion von Entzündung und Karzinogenese interessant, da eine veränderte Expression der Defensine im prämaligen oder malignen Gewebe eine vermehrte Invasion von Bakterien mit konsekutiv vermehrter Entzündung bedingen könnte.

Zusammenfassend besteht ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen Entzündung und der Karzinogenese des KKR. Aus den in der Einleitung dargelegten Überlegungen und dem aktuellen Wissensstand ergeben sich folgende

Hypothesen und Fragestellungen, denen im Rahmen dieser Doktorarbeit nachgegangen werden soll:

1.5 Fragestellungen

- Sind bei Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen im Gegensatz zu Kontrollpatienten Unterschiede für Marker der systemischen Bakteriämie oder Entzündung nachweisbar?
- Sind in der neoplastischen und normalen Kolonschleimhaut von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen im Gegensatz zu Kontrollpatienten Unterschiede in der Expression der Defensine HBD-1, HBD-2, HD-5 auf mRNA Ebene und immunhistochemisch im Gewebe nachweisbar?
- Sind in der neoplastischen und möglicherweise bereits in der normalen Kolonschleimhaut von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen im Gegensatz zu Kontrollpatienten quantitative Unterschiede in der Proteinexpression von Calprotektin nachweisbar?
- In welchen Zellen ist immunhistochemisch eine Expression von Calprotektin in der neoplastischen und normalen Kolonschleimhaut von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen im Gegensatz zu Kontrollpatienten nachweisbar und besteht eine Assoziation zur Granulozyteninfiltration?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Material

In den nachfolgenden Kapitel werden die genutzten Geräte und Materialien sowie Hersteller und Herstellungsort in tabellarischer Form aufgeführt.

2.1.1 Geräte

Sämtliche in Tabelle 1 aufgeführte Geräte sind im Rahmen der Doktorarbeit genutzt worden und gehörten zur Grundausstattung des Labors. Falls zum Verständnis notwendig, sind genaue Art und Anwendung der Geräte im Methodenteil detailliert erklärt.

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Mettler AK160	Mettler- Toledo GmbH, Giessen
Brutschrank	Kelvitron®	Heraeus, Hannover
ELISA-Reader	Universal Microplate Reader EL 800	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
ELISA-reader für TNF- α Bestimmung	DYNEX MRX 2	DYNEX- Instrumental
Flachbrett- Gelelektrophorese- Apparatur	The Unbreakable Horizontal Minigel System	Owl Scientific Inc., USA

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Gelschlitten	EASY-CAST™ Electrophoresis System, Model B2 und Model B1A	WTW, Weilheim
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach
Mikroliterpipetten		Eppendorf, Hamburg Roth, Karlsruhe
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Göttingen
Mikroskop- Skalierungslinial		Zeiss, Göttingen
pH-Meter	Microprocessor pH-Meter, pH 196	Beckman, München
Spectrometer	UV-DU 460 Spectrometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipettus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Real-Time Light-Cycler	LightCycler 1.5 Instrument	Roche, Mannheim
Schüttler	Rotomax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach
Spannungstransformator (Gelelektrophorese)	Model 200/2.0 Power Supply	Bio Rad, München
Stickstoffbehälter	Apollo	Messer, Griesheim

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Thermoblock	TB1 Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermocycler	T Gradient, T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Ultra-Turrax	Ultraturrax	Jahnke & Kunkel KG, Staufen
UV-Photoanlage	FLX-20M	Vilber Loumat, Frankreich
Vortex	Omnilab REAX 2000,	Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach
Wasserbad	1083 SW20C	GFL, Burgwedel Julabo, Seelbach
Zentrifugen	2 K 15, 4 K 10 Biofuge A, Biofuge 22R, Megafuge 1.OR, Minifuge GL, Sepatech	Sigma, Osterode Heraeus, Hannover

Tabelle 2: Geräte, Typbezeichnung und Hersteller

2.1.2 Materialien

Sämtliche aufgeführte Materialien sind im Rahmen der Doktorarbeit genutzt worden. Sie sind nachfolgend in tabellarischer Form je nach Verwendungszweck unterteilt aufgeführt.

2.1.2.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typbezeichnung	Hersteller
Biosphere Filter Tips		Sarstedt
Endosafe Tubes	10 x 75 mm und 13 x 100 mm	Charles River Endosafe, England
Filterpapier	240 mm	Schleicher& Schuell, Dassel
Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg
Schraubröhrchen	15 ml	Sarstedt

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien, Typbezeichnung und Hersteller

2.1.2.2 Chemikalien

In der nachfolgenden Tabelle sind sämtliche im Rahmen dieser Doktorarbeit genutzten Chemikalien aufgeführt. Im Methodenteil ab Kapitel 2.2 sind diese Chemikalien in der jeweiligen Methodik im Detail erläutert.

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Aqua ad iniectabilia	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
MgCl ₂	Sigma, Deisenhofen
DAB-Lösung	DAKO, Hamburg
DEPC- Wasser	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
Diaminbenzidin	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
Dimethylforamid	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
dNTP	Pharmacia, Freiburg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Glykogen	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
H ₂ O ₂	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HCl	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
Isopropanol p.a.	Merck, Darmstadt
Kontrollstandard für Endotoxin (E.coli 055:B5)	Charles River, England
Levamisole	Sigma, Deisenhofen
Limulus Amöbozyten Lysat, Empfindlichkeit: 0,03 EU/ml	Charles River, England
6x Loading Solution	Fermentas, St. Leon-Rot

Chemikalie	Hersteller
Marker VIII	Roche, Mannheim
MMLV-RT- (RNaseH9-Puffer)	Promega, Madison , USA
NaCl	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Naphtol-AS-D-Chloracetat	Sigma, Deisenhofen
Neufuchsin	Sigma, Deisenhofen
Pararosailin- Lösung	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
SDS	Sigma, Deisenhofen
Superscript	Gibco BRL, Eggenstein
Taq Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
Thiomersal	Apotheke, UKSH Campus Lübeck
Tricine	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
TRIzol	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein
Tween20	Sigma, Deisenhofen
LightCyclerFastStart-DNA-Master-SYBR-Green-I-Mix	Molecular Probes, Netherlands
Veronal-Acetat-Puffer nach Michaels	Apotheke UKSH Campus Lübeck
Wasser, autoklaviert	Apotheke, UKSH Campus Lübeck

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Hersteller

2.1.2.2.1 Puffer und Stammlösungen

In der nachfolgenden Tabelle sind sämtliche im Rahmen dieser Doktorarbeit genutzten Puffer und Stammlösungen aufgeführt. Alle Puffer wurden selbst hergestellt. Im Methodenteil ab Kapitel 2.2 sind diese Puffer und Stammlösungen in der jeweiligen Methodik im Detail und mit Erläuterung der Abkürzung erklärt.

Puffer/ Stammlösung	Zusammensetzung
Citratpuffer	2,1 g Citratpuffer auf 1000 ml a.d.(0,01M, pH 6,0)
TAE 50fach	121 g Tris mit 28,6 ml Eisessig und 50 ml 0,5 M EDTA (pH 8) auf 500 ml mit Aqua dest. Auffüllen
TBS für APAAP	10,125 g NaCl auf 1125 ml a.d. + 125 ml Tris-Stammlösung
TBS für Peroxidase	500 mM NaCl + 20 mM Tris, pH 7,5
Tris-Stammlösung	12 g Tris auf 2000 ml a.d. mit HCl auf pH 7,4 eingestellt
TTBS	0,05% Tween20
Verdünnungspuffer für monoklonalen Antikörper Kaninchen-anti-Maus	1600 µl TBS + 400 µl hitzeinaktiviertes Humanserum
Verdünnungspuffer für primären Antikörper	TBS + 2% BSA

Tabelle 5: Zusammensetzung und Bezeichnung der benutzten Puffer und Stammlösungen

2.1.2.4 Kommerzielle Kits und Antikörper

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden einige kommerziell erhältliche Kits angewandt. In der nachfolgenden Tabelle sind sämtliche im Rahmen genutzten Kits

aufgeführt. Im Methodenteil ab Kapitel 2.2 sind die jeweiligen Kits erklärt, die Anwendung erfolgte nach der vom Hersteller empfohlenen Anleitung.

Bezeichnung und Art des Kits	Hersteller
KIT ELISA TNF- α	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
PhiCal / Calprotektin	Immundiagnostik, Benzheim

Tabelle 6: Art und Hersteller der genutzten Kits.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit genutzten Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Nachfolgend sind sowohl die Primärantikörper als auch die jeweiligen sekundären und tertiären Antikörper aufgeführt. Details wie Verdünnung und Inkubationsdauer sind im Methodenteil ab Kapitel 2.2 aufgeführt.

Antikörper	Code- Nr.	Hersteller
APAAP (Maus), (monoklonale anti- alkalische Phosphatase, Klon: AP7/6/7)	Code- Nr.: D0651	DAKO, Kopenhagen, Dänemark
CD3 (Kaninchen-anti- humane T-Zellen)	Code-Nr.: A0452	DAKO, Kopenhagen, Dänemark
Kaninchen-anti-Maus- Immunglobulin	Code-Nr.: Z0259	DAKO, Kopenhagen, Dänemark

Antikörper	Code- Nr.	Hersteller
Monoklonaler Maus-anti-Mensch (Myeloid/Histiozyten-Antigen, Klon MA C387)	Code- Nr.: N 1570	DAKO, Kopenhagen, Dänemark
Monoklonaler Überbrückungsantikörper Maus-anti-Kaninchen-Immunglobulin (Klon MR12/53)	Code-Nr.: M0737	DAKO, Kopenhagen, Dänemark
Polyklonaler Ziege- Anti-Maus- IgG- Antikörper, HPO- konjugiert	Code- Nr.: 115-035-003	Dianova
Präimmun Kaninchenserum		Thomas Ganz, UCLA, USA

Tabelle 7: Verwendete Antikörper und Hersteller

2.1.2.5 Primer

In unten angeführter Tabelle sind sämtliche Vorwärts- und Rückwärts-Primer und die durch das jeweilige PCR-Produkt determinierten Genabschnitte aufgelistet. Sämtliche Primer sind vom 5'- zum 3'-Ende angeführt.

Detektiertes Gen	Vorwärts	Rückwärts
HD-5	cgc cat cct tgc tgc cat tet	aac ggc cgg ttc ggc aat agc
HD-6	gtg ggg caa atg acc agg act	tcc ctc aga ggc agc aga atc
HBD-1	cct acc ttc tgc tgt tta ctc	act tgg cct tcc ctc tgt aac
HBD-2	tgc ctc ttc cag gtg ttt ttg	ctt ttt gca gca ttt tgt tcc
GAPDH	tgc ctc ctg cac cac caa ctg	cgc ctg ctt cac ccc ctt ctt

Tabelle 8: Vorwärts- und Rückwärts-Primer und die Gene der jeweiligen PCR-Produkte

2.1.3 Untersuchungsmaterialien

Alle Untersuchungen wurden mit menschlichem Material von Patienten der Abteilung für Gastroenterologie/ Medizinische Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins durchgeführt. Konsekutiv im Zeitraum zwischen 1999 und 2003 wurden dabei Proben gesammelt von Patienten, die sich einer Darmspiegelung unterzogen, dabei wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien berücksichtigt.

Einschlusskriterien: Alter über 18 Jahre,

Einverständnis in Biopsieentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken,

Nachweis eines Adenoms oder Karzinoms für die entsprechende Gruppe.

Ausschlusskriterien: Adenom/ Karzinom (auch anamnestisch) für die

Kontrollgruppe,

Kontraindikationen gegen Biopsien,

entzündliche Darmerkrankung,

Fehlende schriftliche Einverständniserklärung.

Bei den Patienten der Kontrollgruppe durften in der Endoskopie weder makroskopisch noch histologisch pathologische Veränderungen der Darmschleimhaut festgestellt worden sein. Es wurden jeweils 2 Biopsien mit einer Standardbiopsiezange entnommen und sofort bei -80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei Patienten mit Karzinom und Adenom erfolgten die Biopsien aus der Tumormitte bzw. Polypenspitze. Aus demselben Bereich wurden Biopsien für die Standardpathologie zur Bestätigung der histopathologischen Diagnose und dem Nachweis von vitalem neoplastischem Gewebe entnommen. Bei den Adenomen wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen die komplette Polypektomie möglich war und der komplette Polyp zur histopathologischen Diagnose gesandt wurde. Sowohl bei den Patienten mit Adenom als auch mit Karzinom wurden für die mRNA Expressionsanalyse der Defensine als für die quantitative Calprotektinbestimmung auch Biopsien aus tumorfernem Normalgewebe entnommen und analysiert. Bei den Kontrollpatienten erfolgte die Biopsie im Sigma. Von allen Patienten wurden 10ml Serum aus Vollblut für die unten angeführten Untersuchungen entnommen. Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten anhand des Materials aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden unter Verwendung einer modifizierten Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode für das humane β -Defensin 2 (HBD-2), das humane α -Defensin 5 (HD-5) und für Calprotektin durchgeführt. Für das humane β -Defensin 1 (HBD-1) wurde die indirekte Immunperoxidase-Färbemethode benutzt. Beide Methoden beruhen auf dem Sichtbarmachen der Bindung eines Primärantikörpers über eine

enzymatische Umsetzung eines Substrates zu einem Farbstoff. Bei der APAAP-Methode wird über Antikörperbrücken eine Erhöhung der Sensitivität erreicht. Hierbei wird der monoklonale Primärantikörper durch einen unspezifisch diese Tierspezies erkennenden Brückenantikörper detektiert. Danach wird ein dritter Antikörper, an den der umsetzende Enzymkomplex gekoppelt ist, zu der Reaktion gegeben. Dieser Antikörper stammt aus derselben Spezies wie der Primärantikörper und bindet an den Brückenantikörper. Bei der APAAP-Methode schließt sich nach diesem Schritt eine Mehrfachinkubation vom Brücken- und Enzymkomplexen an. Durch dieses Verfahren werden zusätzliche Enzymmoleküle an die Antigenbindungsstelle gebracht und die Farbreaktion verstärkt.

Bei der Immunperoxidasefärbung wird als Sekundärantikörper direkt ein enzymkonjugierter Antikörper verwendet.

Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten Serum nichtimmunisierter Tiere bzw. anti-CD3. Das polyklonale Kaninchenantiserum wurde freundlicherweise von Thomas Ganz, University of California, Los Angeles, USA, zur Verfügung gestellt. Nachfolgend werden Methodik der APAAP- und der indirekten Immunperoxidasefärbung genauer erläutert.

2.2.1.1 APAAP

Die Defensine HBD-2 und HD-5 und Calprotektin wurden mit der APAAP-Methode gefärbt. Zunächst erfolgte eine einstündige Inkubation der Paraffinschnitte bei 60°C im Brutschrank. Es folgte die Entparaffinisierung mittels einer Alkoholreihe. Hierfür wurden die Schnitte nach einer kurzen Abkühlzeit zunächst zweimal 10 min in Xylol und anschließend für jeweils 3 min in absteigender Konzentration in 100%, 96%, und 70% Alkohol getaucht, anschließend wurde mit Aqua dest. gespült. Um das zu detektierende Epitop dem Antikörper zugänglich zu machen ("antigen retrieval") wurden die entparaffinisierten Schnitte in Citratpuffer in der Mikrowelle 10 min vorsichtig erhitzt. Die Schnitte mussten während der gesamten Zeit mit Citratpuffer bedeckt sein, um eine Hemmung der endogenen

Peroxidase zu gewährleisten. Anschließend wurde mit TBS gespült, die zu untersuchende Fläche mit einem Fettstift markiert und 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt.

Im Fall von HBD-2 wurden die Schnitte zusätzlich zur enzymatischen Andauung für 5 min bei Raumtemperatur mit 50 µl 0,1% Trypsin bedeckt, danach wurde das Trypsin mit TBS gründlich abgespült. Der Verdünnungspuffer für die primären Antikörper wurde aus TBS + 2% BSA im Verhältnis 1:1 zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen hergestellt. Es hat sich gezeigt, dass Rinderserumalbumin die Proteinkonzentration erhöht, die unspezifischen Bindungen des Primäantikörpers mit Strukturen des zu untersuchenden Gewebes vermindert und somit zu einer Reduktion unspezifischer Färbung führt.

Für die einzelnen aus der Spezies Maus stammenden Antikörper wurden folgende Konzentrationen verwendet:

HBD-2: 1:2000,

HD-5: 1:400,

CD3: 1:100,

Präimmun: 1:1000.

Die jeweiligen primären Antikörper wurden in den entsprechenden Verdünnungen in einem Volumen von jeweils 50 µl in der feuchten Kammer aufgetragen und nach einer Inkubationszeit von 60 min dreimal für je 5 min bei Raumtemperatur mit TBS gewaschen. Für die primären Antikörper aus der Maus wurde eine Verdünnung von 1:50 mit TBS + 2% BSA angesetzt. Die Inkubation wurde 30 min in der feuchten Kammer durchgeführt. Der Sekundäantikörper Kaninchen-anti-Maus wurde mit einem Puffer aus vier Teilen TBS und einem Teil hitzeinaktiviertem Humanserum in einem Verhältnis von 1:25 verdünnt. Die Inkubationszeit lag bei 30 min.

Der APAAP-Komplex wurde wiederum mit TBS + 2% BSA in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt, aufgetragen und 30 min auf den Schnitten belassen. Zur Erhöhung der Sensitivität folgte eine Mehrfachinkubation mit dem Kaninchen- anti-Maus-Antikörper und dem APAAP-Komplex, wobei jeweils für 7 min inkubiert und

anschließend mit TBS gewaschen wurde. Die Schritte wurden jeweils zweimal durchgeführt.

Zur Sichtbarmachung der Reaktionen diente die Neufuchsin-Methode. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Hierfür wurden zunächst folgende drei Lösungen hergestellt.

Lösung I: 140 µl 5% Neufuchsinlösung + 350 µl 4% Natriumnitrit

Lösung II: 50 ml 0,05 M Trispuffer mit einem pH von 9,7 + 0,15 M NaCl + 18 ml 0,2 M 2-Amino-2-methyl-propan-1,3-diol-Puffer + 50 mg Levamisol (Levamisol diente der Unterdrückung der endogenen alkalischen Phosphataseaktivität)

Lösung III: 35 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat + 420 µl N,N-Dimethylformamid

Lösung I und II wurden vermischt, dann wurde Lösung III dazugegeben. Das Gemisch wurde mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 8,7 eingestellt. Diese Lösung wurde filtriert und wenige Minuten auf den Objektträgern belassen bis eine Färbung deutlich wurde.

Folgende Waschschrte schlossen sich der Inkubation an:

Leitungswasser: 3 min

4% Formalin: 2 min

Leitungswasser: 3 min.

Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für 15 min. Zehnminütiges Spülen mit warmem Leitungswasser brachte die Reaktion zum Stoppen. Die fertigen Schnitte wurden mit Aquatex eingedeckt.

2.2.1.2 Indirekte Immunperoxidasefärbung

Das humane β -Defensin HBD-1 wurde mit der indirekten Immunperoxidase-reaktion gefärbt. Auch bei dieser Methode wurden die Schnitte zunächst 1 h bei 60°C im Brutschrank inkubiert und anschließend mittels einer Alkoholreihe entparaffiniert. Diese wurde wie folgt durchgeführt:

zweimal für je 3 min Xylol, anschließend zweimal für 2 min Ethanol abs., dann jeweils 2 min Bäder in 90% Ethanol und in 75% Ethanol. Beendet wurde die Alkoholreihe durch zweimaliges Spülen in Leitungswasser.

Die Schnitte wurden zur Verringerung der Hintergrundfärbung drei Mal je 5 min mit Tris-gepuffertes Kochsalzlösung gewaschen. Zur Sättigung der endogenen Peroxidase wurde jeder Objektträger mit 50 µl 0,1 M Wasserstoffperoxid bedeckt. Nach 5 min wurde wieder mit TBS gespült.

Zur Reduktion der Hintergrundfärbung wurden die Schnitte mit 50 µl 3% Gelatine, welche zuvor bei 38°C im Wasserbad in TBS in Lösung gebracht wurde, bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die Objektträger mit TBS gespült. Es schlossen sich nun die eigentlichen Färbeschritte an. Bei jeder Färbung wurde Ziegsenserum als Positiv- und Präimmun als Negativkontrolle mitgeführt.

Zur Verdünnung der Primärantikörper wurde 0,5 g Gelatine + 0,005 g Thiomersal in 50 ml TTBS gelöst. Die Zugabe von Tween-20 zu der Tris-gepufferten Kochsalzlösung diente der Erhöhung des Salzgehaltes und somit einer weiteren Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung.

Es galten folgende Verdünnungsverhältnisse:

Anti-HBD-1: 1:500

Präimmun: 1:800.

Die Inkubationszeit der Primärantikörper betrug 18 h bei Raumtemperatur, es wurden pro Objektträger 50 µl aufgetragen. Nicht gebundene Antikörper wurden mittels dreimaligen Waschens mit TTBS für jeweils 10 min wieder von den Objektträgern entfernt. Als Sekundärantikörper diente ein polyklonaler HPO-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Zur Verdünnung des Ziege-anti-Kaninchen-IgG wurde im Verhältnis 1:2000 der gleiche Verdünnungspuffer wie bei den Primärantikörpern verwendet. Die Inkubationszeit betrug wiederum 18 h. Es schloss sich auch hier dreimalig 10 min Waschen mit TTBS an.

Als Chromogen bei der Enzymreaktion diente Diaminobenzidin (DAB). Zur Herstellung der DAB-Substratlösung wurde eine 30 mg Tablette DAB in 50 ml 50 mM Tris gelöst und auf einen pH von 7,6 eingestellt. Kurz vor Gebrauch wurde

1 ml dieser Lösung mit 1,5 µl Wasserstoffperoxid vermischt. Je 50 µl dieser DAB-Lösung wurden für 10 min auf die Präparate gegeben.

Die Reaktion wurde durch 10 min Spülen mit Leitungswasser gestoppt. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 5 min mit Hämatoxylin bedeckt. Nach abschließenden 10 min Leitungswasser gespült wurde, wurden die Präparate mit Aquatex eingedeckt.

2.2.2 RT-PCR

Ergänzend zur Detektion der Defensine auf Proteinebene wurde ihre Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Hierzu wurden Zangenbiopsien gewonnen, sofort nach Entnahme schockgefrorenen und bis zur Weiterverarbeitung auf flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.1 RNA-Isolation

Aus den Kolonschleimhautbiopsien konnten 50 – 100 µg RNA gewonnen werden.

Für die Extraktion wurden die Gewebeproben jeweils mit 1 ml TRIzol versetzt und mit einem Ultra Turrax homogenisiert.

Dieser wurde nach jeder Probe in folgender Reihenfolge gewaschen: 10% SDS, 1 M NaOH, autoklaviertes Wasser, 70% Ethanol und zum Schluss ein zweites Mal autoklaviertes Wasser.

Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden je 200 µl Chloroform zugegeben und kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 2- 3 min bei Raumtemperatur wurde mit 12000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Es folgten weitere 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und 10 min Zentrifugation mit 12000 g bei 4°C. Nun wurde der Überstand verworfen und der Unterstand 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Vor dem Einfrieren bei -70°C wurde das Isolat mit jeweils 20 µl RNase-freiem Wasser diluiert.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine reverse Transkription durchgeführt, um die RNA in cDNA zu überführen. Es wurde mit einem Ansatzvolumen von 20 μl gearbeitet. Zunächst wurden 2 μg RNA in 9 μl autoklaviertem Wasser vorgelegt und mit 1 μl oligo-dT18-Primer gemischt. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und 10 min bei 70°C inkubiert.

Anschließend wurden 0,4 μl RNase Inhibitor, 4 μl MMLV-RT-(RNaseH)-Puffer, 1 μl dNTP-Mix (Endkonzentration von je 500 μM), 0,4 μl DTT 1 M, 3,2 μl autoklaviertes Wasser und 1 μl reverse Transkriptase (Superscript) zugegeben. Es schloss sich eine Inkubation von 1 h bei 37°C an. Das Reaktionsprodukt wurde mit autoklaviertem Wasser in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und bei -30°C gelagert.

2.2.2.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die RT-PCRs wurden nach dem in Tabelle 9 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Reaktions- Volumen	50 µl	Touch down	Nein
Template	5 µl	Initiale Denaturierung	94°C, 5 min
Primer I (forward)	200 nM	Denaturierung	94°C, 30 s
Primer II (reverse)	200 nM	Annealing	60°C, 30 s
dNTP	200 µM	Elongation	72°C, 1 min
Taq- Polymerase	1,25 U	Zyklen	35
Hot start	Ja	Terminale Elongation	72°C, 7 min

Tabelle 9: PCR-Protokoll

2.2.2.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Im Anschluss an die Amplifikation wurden die PCR-Produkte durch eine horizontale Gelelektrophorese mit 2% Agarosegel sichtbar gemacht. Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle kurz zum Kochen gebracht und anschließend wieder auf 50°C abgekühlt. Als Fluoreszenzfarbstoff für die spätere Sichtbarmachung der einzelnen

Banden diente Ethidiumbromid. In einem Volumen vom 1 μl wurde die Ethidiumbromidlösung dem Agarosegel zugefügt. Das Gemisch wurde in die Gelkammer gegossen und zum Aushärten stehengelassen. Hatte sich ein festes Gel gebildet so wurde die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer aufgefüllt. Die zu untersuchenden Proben wurden vorbereitet in einem Volumen von 12 μl mit 2 μl 6x Loading Solution und 10 μl Probe in Terasaki-Platten gemischt. Nach vorsichtiger Herausnahme des Kammes konnte der Probenansatz in die Taschen pipettiert werden. Als Längenmarker diente Marker VIII, dieser wurde in einem Volumen von 5 μl in eine Tasche pipettiert. Bei einer Stromspannung von 80 V wurden die DNA-Fragmente während 1 h aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Strahlung fotografiert.

2.2.3 Real- time RT-PCR

Eine Quantifizierung der RNA ist mit der herkömmlichen PCR-Methode schwer zu ermitteln. Für eine Quantifizierung wurden daher Real-Time RT-PCRs durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Einbau eines fluoreszierenden Farbstoffs, dessen Fluoreszenz während der Reaktion gemessen wird. Die Intensität steigt mit der Höhe der Anfangskopienzahl der cDNA in der Probe. Durch den Bezug auf einen mitgeführten Standard kann so die Kopienzahl ermittelt werden.

Die Genexpression der Defensine HBD-1, -2 und HD-5 und -6 wurden mit einem Fluoreszenz Temperatur Cycler ermittelt. Als Reaktionsgemisch wurden 2 μl cDNA, dies entsprach 50 ng RNA, mit 4 mM MgCl_2 , 0,5 μM Primer und 1 μl LightCyclerFastStart-DNA-Master-SYBR-Green-I-Mix in Kapillarröhrchen gebracht. Die initiale Denaturierung bei 95 °C erfolgte in dem Lightcycler für 10 min. Es schlossen sich 45 Zyklen an. Jeder Zyklus begann mit einer Erhitzung auf 95 °C für 15 s. Es folgte ein „touchdown“ von 5 s auf -1 °C pro Zyklus, ausgehend von der Primer spezifischen Ausgangstemperatur. Für weiter 10 s wurde auf 72 °C erhitzt. Ein Schmelzkurvenprofil wurde am Ende jedes Durchgangs erstellt. Hierfür

wurde die Proben auf 65 °C abgekühlt und nach 15 s langsam in 0,2 °C/s-Schritten wieder auf 95°C erwärmt. Die Fluoreszenz wurde dabei kontinuierlich gemessen und so die Amplifikation des jeweils spezifischen Transkripts bestätigt. Die bei jedem Zyklus auf dem Bildschirm sichtbare Emission wurde mittels LightCycler Software analysiert.

2.2.4 Limulus Amöbozyten Lysat (LAL-) Test

Um bei den Probanden eine allgemeine schwere Entzündung auszuschließen, wurde der *Limulus Amöbozyten Lysat-* (LAL-) Test durchgeführt.

Bei diesem Test handelt sich um eine Gel-Clot Methode. Schon in Anwesenheit winziger Mengen von Pyrogenen kommt es zu einer Gelbildung zwischen diesen und dem LAL. Dabei katalysieren Endotoxine die Aktivierung eines Proenzym im LAL. Das aktivierte Enzym hydrolysiert spezifische Bindungen in einem Gerinnungsprotein, welches ebenfalls im LAL vorkommt.

Zunächst wurde das LAL-Pulver in dem vom Hersteller angegebenen Volumen in Aqua ad iniectabilia gelöst. Das so erzeugte LAL-Reagenz wurde dann zu je 100 µl in endotoxinfreie Borosilikatröhrchen überführt und konnte so abgedeckt bei -20°C bis zu 4 Wochen gelagert werden. Einmal aufgetautes Reagenz wurde nicht wieder eingefroren. Das Kontroll-Standard-Endotoxin (CSE) wurde in dem auf dem jeweilig beigelegten Zertifikat verzeichneteten Volumen Aqua ad iniectabilia gelöst und 5 min auf dem Vortex gemischt. Als Positivkontrolle musste das CSE bis zu einer Konzentration von 0,6 EU/ml mit Aqua ad iniectabilia weiter verdünnt werden. Stammlösung und die weiter verdünnte Positivkontrolle waren bei 2- 8°C mit Parafilm abgedeckt bis zu 4 Wochen lagerbar.

Da die Reaktion des Limulus Amöbozyten Lysat durch zahlreiche Substanzen gehemmt werden kann, musste jede zu untersuchende Probe zunächst auf Produkthemmung getestet werden. Hierzu wurden die Proben mit Aqua ad iniectabilia in den Konzentrationen 1:1 bis 1:512 verdünnt. Jede Verdünnung wurde in einer vierfach Testung untersucht, das bedeutet, dass jeweils zwei Proben mit und zwei Proben ohne Endotoxinstandard pro Verdünnung getestet wurden.

Dazu wurden zu jedem LAL-Reagenz 100 µl der jeweiligen Verdünnung gegeben. Bei Testungen mit Kontrollstandard wurden zusätzlich 10 µl CSE hinzugegeben. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Eine Positiv- und Negativkontrolle mit 100 µl Aqua ad iniectabilia wurde ebenfalls bei jedem Versuchsansatz in Doppelbestimmung mitgeführt. Die Röhren wurden vorsichtig kurz aufgeschüttelt und sofort in den auf 36°C vortemperierten Heizblock gestellt. Hier mussten sie exakt 60 min erschütterungsfrei verbleiben. Das Ergebnis musste nach dieser Zeit binnen 60 s abgelesen werden. Der Test galt als positiv, wenn sich ein Gel gebildet hatte, das beim Kippen des Röhrchens um 180°C am Röhrchenboden haften blieb. Ein negatives Ergebnis lag vor, wenn sich entweder kein Gel gebildet hatte oder wenn das Gel beim Kippen des Röhrchens nicht intakt blieb. War das Ergebnis viermal reproduzierbar, so konnte nach Ausschluss von Produkthemmung die eigentliche Testung durchgeführt werden. Der Testaufbau und Ablauf waren identisch mit den Vortestungen.

2.2.5 Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

TNF- α wurde mit Hilfe eines Quantikine TNF- α HS Immunoassay Kits mittels der Sandwich-Immuno-Enzym Technik im Serum bestimmt. In eine mit TNF- α spezifischem Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte wurden je 50 µl Assay Diluent HD1-11, Standardlösung und die jeweilige Probe in einem Volumen von 200 µl pipettiert. Während der dreistündigen Inkubation bei Raumtemperatur konnten das vorhandene TNF- α an den immobilisierten Antikörper gebunden werden. Ungebundene Substanzen wurden entfernt. Hierzu wurde zunächst die überstehende Flüssigkeit vorsichtig entfernt, die Platten über Kopf 5 min getrocknet, anschließend wurde mit 400 µl Waschpuffer im "Autowasher" gewaschen. Der Waschvorgang wurde insgesamt 6-mal durchgeführt und die Platten abschließend mindestens 10 Mal vorsichtig ausgeklopft. 200 µl TNF- α HS Konjugat wurden pipettiert, die Mikrotiterplatten abgedeckt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es schlossen sich wieder die sechs Waschschriffe an, bevor die Platten mit 50 µl Substratlösung 1 h inkubiert wurden. Anschließend

wurde für weitere 30 min mit Amplifierverstärkerlösung inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl Stopplösung beendet. Die Farbintensität wurde mittels Elisareader bei 490 nm gemessen.

2.2.6 Calprotektin

Calprotektin wurde sowohl quantitativ mittels ELISA bestimmt als auch immunhistochemisch untersucht.

2.2.6.1 Calprotektinbestimmung mittels ELISA

Calprotektin wurde mittels ELISA in den Gewebeproben und im Serum der Patienten gemessen.

Ein gegen Calprotektin gerichteter Antikörper ist auf einer Mikrotiterplatte fixiert. Die kommerziell erworbenen Platten wurden vor Gebrauch 5 Mal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen, nach dem letzten Waschgang wurden sie auf Saugpapier ausgeschlagen. Es wurden 100 µl Standard und die vorverdünnten Proben pipettiert. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde der Platteninhalt verworfen und anschließend 5 Mal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen. Die Platten wurden nach dem letzten Waschgang wieder auf Saugpapier ausgeschlagen.

100 µl des vorverdünnten zweiten biotinylierten Antikörpers wurde dazu pipettiert und wieder 1 h bei 31°C auf dem Thermoblock inkubiert. Der Platteninhalt wurde wiederum verworfen. Nach fünfmaligem Waschen und anschließendem Ausklopfen auf Saugpapier wurden 100 µl vorverdünntes Konjugat pipettiert und die Platten 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Der Inhalt wurde wiederum verworfen, die Platten fünfmal gewaschen und anschließend ausgeklopft. Nun wurden 100 µl TMB-Substratlösung pipettiert, 10-20 min in einem abgedunkelten Raum bei Raumtemperatur inkubiert, danach 50 µl Stopplösung zugegeben und alles kurz gemischt. Die Extinktion wurde dann im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm gemessen. Der Gehalt an Calprotektin wurde mit dem Gesamtproteingehalt ins Verhältnis gesetzt.

2.2.6.1.1 Gesamt-Proteinbestimmung

Zunächst wurde der Gesamtproteingehalt in den Biopsien gemessen, um eine Referenz für die Calprotektinwerte zu erhalten.

Die Biopsien wurden dafür in 500 µl kalten PBS gegeben und anschließend mit dem Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenisat wurde dreimal 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weiter gearbeitet, der Unterstand verworfen. Die Proben wurde mit Aqua dest. in den Verhältnissen 1:1 bis 1:128 verdünnt. Als Standard für die Messungen wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA in PBS angesetzt. Hierfür wurden zunächst die Stammlösung mit 10 mg BSA in 1 ml PBS hergestellt. Es wurde dann eine Standardverdünnungsreihe von 1,4 mg/ml in 0,2 mg/ml Schritten bis 0,1 mg/ml hergestellt. Die Stammlösung diente als Negativkontrolle. Zu je 20 µl Probe bzw. Standard wurden je 180 µl Farbe gegeben. Die Farbreagenz wurde zuvor maximal eine halbe Stunde vor der Messung im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und filtriert. Alle weiteren Untersuchungen wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die Proteinmessung erfolgte im ELISA-Reader bei 595 nm.

2.2.6.2 Immunhistochemische Färbung von Calprotektin

Die immunhistochemischen Färbungen des Calprotektins wurden nach der oben beschriebenen APAAP-Methode durchgeführt. Als Antikörper diente hier der monoklonale Maus-anti-Mensch-Antikörper (Myeloid/Histiozyten-Antigen, Klon MA C387).

Zur Identifizierung der Granulozyten wurde eine Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Reaktion nach Leder und Stutte durchgeführt (Leder 1964).

Hierfür wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Schnittpräparate verwendet. Zunächst wurden folgende Ausgangslösungen hergestellt:

Lösung A: 1 Tropfen 4% Pararosanilin-Lösung mit
1 Tropfen 45% Natriumnitrit-Lösung vermischen und nach 60 s mit
30 ml Veronal-Acetat-Puffer, pH 7,62 verdünnen.

Der pH wurde anschließend mit 1 M HCl auf 6,3 eingestellt.

Lösung B: 10 mg Naphthol-AS-D-Chloracetat in
1 ml Dimethylformid lösen.

Lösung A und Lösung B wurden vermischt und vor Gebrauch filtriert. Unter ständigem Rühren wurde dann 30 min inkubiert und abschließend mit Leitungswasser gespült. Für die Kernfärbung wurde 1 min mit Hämalaun gefärbt und mit Leitungswasser gebläut. Zum Eindecken haben wir Aquatex verwendet.

Mit der Methode lässt sich eine Anfärbung der neutrophilen Granulozyten, ihrer Vorläuferzellen sowie von Mastzellen erreichen. Die enzymatische Aktivität wird durch einen homogenen, leuchtend roten Farbstoff angezeigt.

2.2.7 C-reaktives Protein (CRP), Carcinoembryonales Antigen (CEA), Albumin und Procalcitonin

Die Werte von C-reaktivem Protein und Albumin wurden mit den gängigen Methoden freundlicherweise vom hiesigen Institut für Klinische Chemie (Direktor: Prof. Dr. med. M. Seyfarth) bestimmt. Das Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach) hat freundlicherweise die Procalcitonin-Bestimmungen im Serum durchgeführt.

Carcinoembryonales Antigen wurde freundlicherweise durch das hiesige Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner) ermittelt.

2.2.8 Statistische Methoden

Alle Ergebnisse wurden, falls nicht anders ausgedrückt, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes bzw. Standardabweichung des mittleren Fehlers (jeweils im Ergebnisteil spezifiziert) ausgedrückt. Mögliche Korrelationen wurden mittels linearer Regressionsanalyse berechnet. Der Vergleich der Gruppen erfolgte durch ungepaarten, nichtparametrischen Test (Mann Whitney). Alle angegebenen p-Werte sind Ergebnisse zweiseitiger Tests. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bei einem p-Wert kleiner 0.05 angesehen. Die statistischen

Auswertungen erfolgten mit Hilfe von kommerzieller statistischer Software (SigmaStat 2.0, Jandel Scientific, San Rafael, USA, GraphPad, InStat Software, Version 2.02, San Diego, USA).

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Biopsiematerial und Blutwerte von insgesamt 28 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, 36 Patienten mit Polypen und von 30 Kontrollprobanden untersucht. Die klinischen Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 10 aufgeführt.

	Karzinomgruppe	Adenomgruppe	Kontrollgruppe
Patientenzahl	28	36	30
Alter in Jahren	64,7 ± 15,5	68,9 ± 11,2	60,8 ± 14,7
Geschlecht (männl./weibl.)	20 / 8	19 / 17	10 / 20
Dukes Stadium			
A	6 (21%)		
B	7 (25%)		
C	5 (18%)		
D	10 (36%)		

Tabelle 10: Klinische Daten der Patienten. Das Alter wurde als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Ansonsten handelt es sich um absolute Patientenzahlen.

3.1 Defensine

Bei den Defensinen wurden die Immunhistochemie und die Ergebnisse der RT-PCR getrennt analysiert und im Folgenden dargestellt.

3.1.1 Immunhistochemische Untersuchung auf Defensine

Es wurde eine Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Dabei wurde die Farbintensität semiquantitativ mit 0, 1, 2 und 3

bewertet. Kam es zu keinerlei Anfärbung wurde dies dem Wert 0 zugewiesen, geringer Nachweis (einzelne Zellen) mit 1, mittlere (bis 50%) mit 2 und starke Intensität (> 50%) mit 3.

3.1.1.1 HBD-1

Das konstitutiv vorkommende β -Defensin HBD-1 zeigte im Normalgewebe die erwartete zytoplasmatische Färbung vereinzelt an Enterozyten. Sowohl bei den Adenomen im adenomatösen, als auch bei den Karzinomen im neoplastischen und in den Kontrollschnitten war teilweise eine HBD-1 Proteinexpression nachweisbar. Eine regelhafte Überexpression oder Verlust der Expression war weder im adenomatösen noch im karzinomatösen Gewebe festzustellen. Beispiele für die beobachteten Färbemuster sind in Abbildungen 1 gezeigt. Eine Zusammenfassung der beobachteten immunhistochemischen Färbescores ist in Tabelle 11 dargestellt.

Färbescore	Karzinomgruppe	Adenomgruppe	Kontrollgruppe
0	30%	9%	21%
1	25%	46%	17%
2	40%	27%	42%
3	5%	18%	20%

Tabelle 11: Färbescores für immunhistochemische HBD-1 Expression in relativem Anteil, bezogen auf die Gesamtzahl der Patienten in der entsprechenden Gruppe.

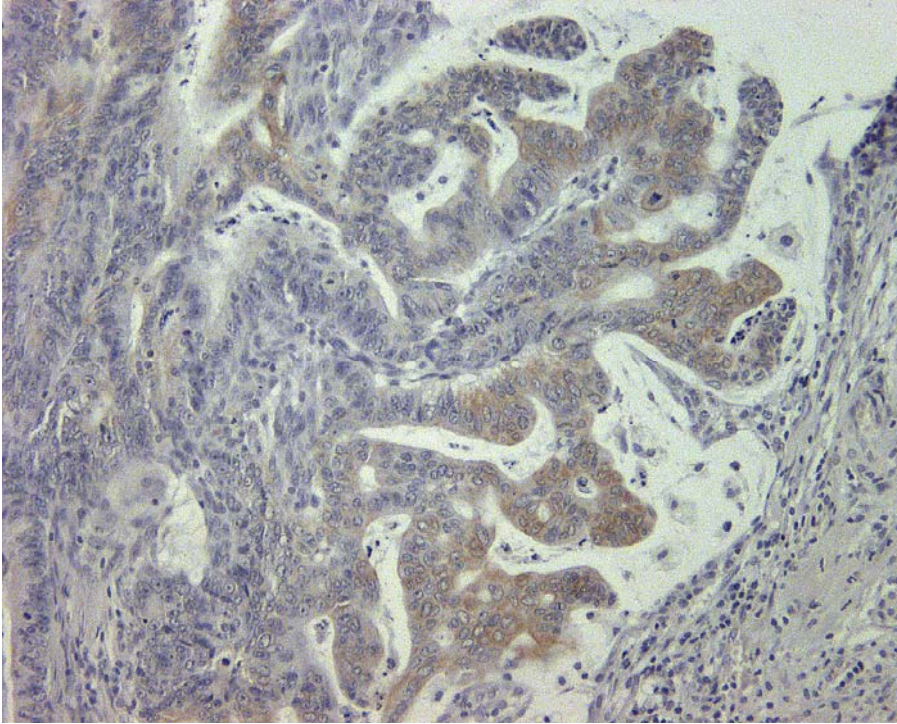


Abb. 1: Immunhistochemische Färbung eines Paraffinschnitts eines Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die HBD-1-Expression kann anhand der PAP-Färbung nachgewiesen werden und stellt sich bräunlich dar. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Vergrößerung der Abbildung beträgt 1:400.

3.1.1.2 HBD-2

Das induzierbare β -Defensin HBD-2 war im Normalgewebe mit einer zytoplasmatische Färbung nur in wenigen Fällen vorhanden. In keinem der Karzinome konnte das Defensin immunhistochemisch nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der beobachteten immunhistochemischen Färbescores ist in Tabelle 12 zu sehen.

Färbescores	Karzinomgruppe	Adenomgruppe	Kontrollgruppe
0	100%	86%	83%
1	0%	14%	17%
2	0%	0%	0%
3	0%	0%	0%

Tabelle 12: Relativer Anteil der Färbescores für die immunhistochemische HBD-2-Expression als relativer Anteil an der Gesamtzahl der Patienten der entsprechenden Gruppe.

3.1.1.3 HD-5

Für das α -Defensin HD-5 war im Vergleich zum HBD-1 eine deutlich schwächere Färbung zusehen. Es kam ebenfalls regelhaft im Normalgewebe zu einer zytoplasmatischen Färbung von Enterozyten an der Basis der Krypten, in Panethzellen. Auch bei HD-5 war keine regelhafte Überexpression oder ein Verlust der Expression im neoplastischen oder prämaligen Gewebe nachweisbar. Ein Beispiel für die beobachteten Färbemuster ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Abbildung stellt ebenfalls wie Abbildung 1 ein Karzinom dar, hier sieht man jedoch in der APAAP- Färbung roterscheinend HD-5. Eine Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbescores ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Färbescores	Karzinomgruppe	Adenomgruppe	Kontrollgruppe
0	45%	9%	35%
1	20%	41%	30%
2	30%	50%	22%
3	5%	0%	13%

Tabelle 13: Färbescores für immunhistochemische HD5-Expression. Angegeben ist der relative Anteil in Bezug auf die Gesamtzahl der Patienten der entsprechenden Gruppe.

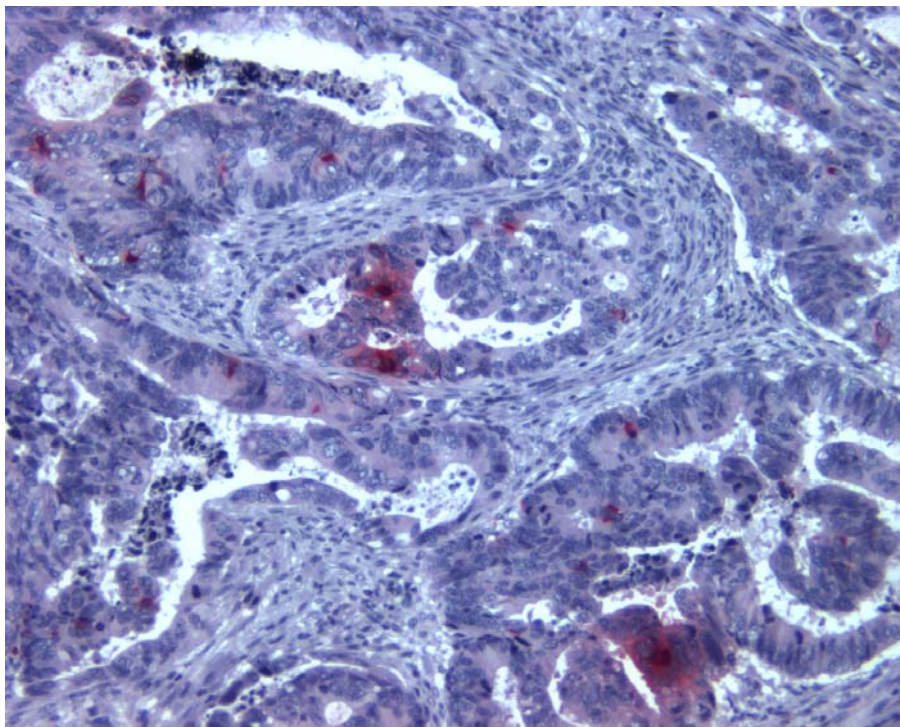


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung eines Paraffinschnitts eines Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die HD-5-Expression kann anhand der APAAP-Färbung nachgewiesen werden und stellt sich rötlich dar. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Vergrößerung der Abbildung beträgt 1:400.

Die immunhistochemischen Färbungen ergaben in der Expression der humanen Defensine HBD-1, -2 und HD-5 somit keine signifikanten Unterschiede. HBD-2 war nur in wenigen Fällen vorhanden, HBD-1 und HD-5 konnten in geringer Menge in allen 3 Gruppen nachgewiesen werden.

3.1.2 Expression von Defensin-mRNA mittels qualitativer RT-PCR

Es wurde jeweils gesunde Schleimhaut (SH) und bei Patienten mit Polyp bzw. Karzinom Material sowohl aus dem Tumor (TU) als auch aus angrenzender makroskopisch unauffälliger Schleimhaut (SH) gewonnen.

Aus den Biopsien wurde die RNA extrahiert. Im Anschluss wurden aus diesen Proben jeweils HBD-1 und -2, HD-5 und -6 bestimmt.

In der RT-PCR zeigte sich für keines der untersuchten vier Defensine HBD-1, und -2 sowie HD-5 und-6 eine qualitativ nachweisbare regelhafte Veränderung im Expressionsmuster. Dies galt sowohl für adenomatös als auch für karzinomatös verändertes Gewebe gegenüber dem Normalgewebe. Auch in den tumorbenachbarten Kolonschleimhäuten war weder zu dem neoplastischen Gewebe noch zum Normalkollektiv mit dieser Methode ein qualitativer Unterschied festzustellen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der RT-PCR ist in Tabelle 14 zu sehen.

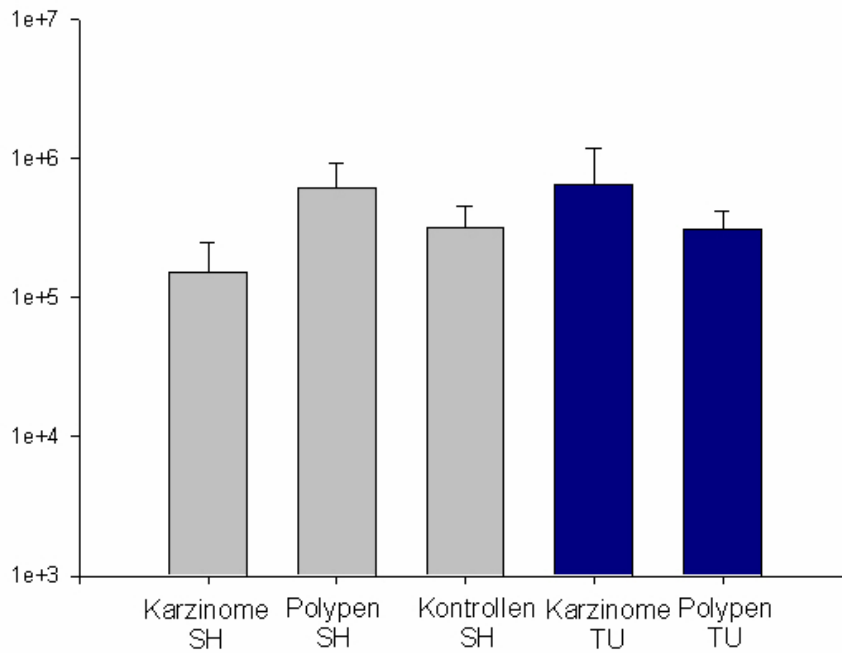
Gewebe	Karzinomgruppe		Adenomgruppe		Kontrollgruppe
	SH	TU	SH	TU	SH
HBD-1	15%	23%	41%	52%	48%
HBD-2	9%	29%	9%	21%	7%
HD-5	77%	76%	77%	79%	69%
HD-6	25%	57%			

Tabelle 14: Häufigkeit des Nachweises der Defensine mittels RT-PCR in Prozent. (SH = makroskopisch normales Schleimhautgewebe, TU = makroskopisch tumorös veränderte Schleimhaut)

3.1.3 Expression von Defensin-mRNA mittels quantitativer Real-Time RT-PCR Analyse

In Analogie zu den Ergebnissen der Immunhistochemie und der qualitativen RT-PCR konnten in den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der quantitativen Expression per Real-Time TR-PCR der Defensine gemessen werden. Wie Grafik 1 zeigt, konnte HBD-1 mRNA passend zur immunhistochemischen Färbung in allen 3 Gruppen nachgewiesen werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen neoplastischem und makroskopisch unauffälligem Gewebe gefunden werden. Die angegebenen Werte sind ohne Einheit dargestellt, da sie sich auf einen mitgeführten Standard beziehen, der gleich 1 gesetzt wurde.

HBD-1 in Biopsien RT-PCR

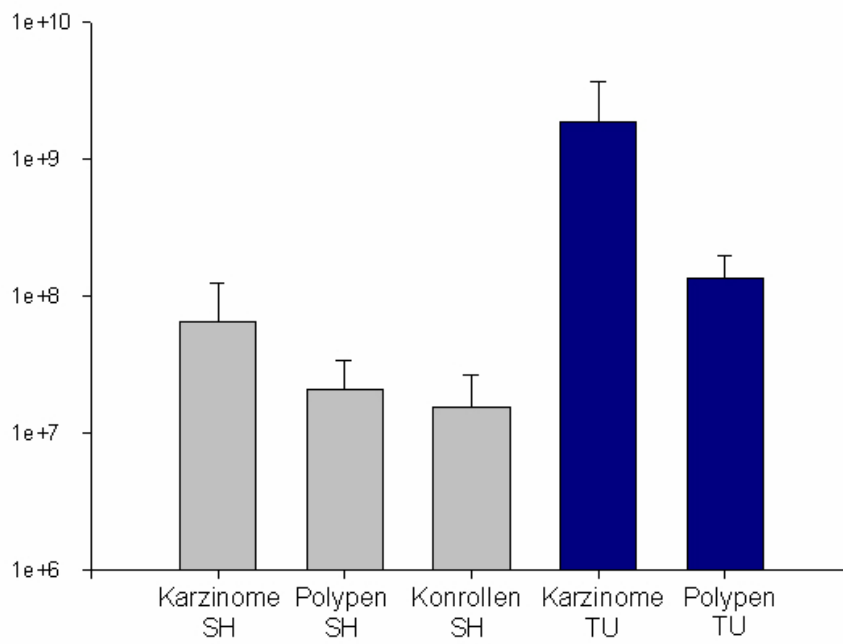


Grafik 1: HBD-1 Expression in der RT-PCR in kolorektalen Biopsie. Es handelt sich um einen relativen Vergleich. Die Skala wurde logarithmisch gewählt.

HBD-2 mRNA konnte auch mit dieser Methode nur in einzelnen Fällen nachgewiesen werden.

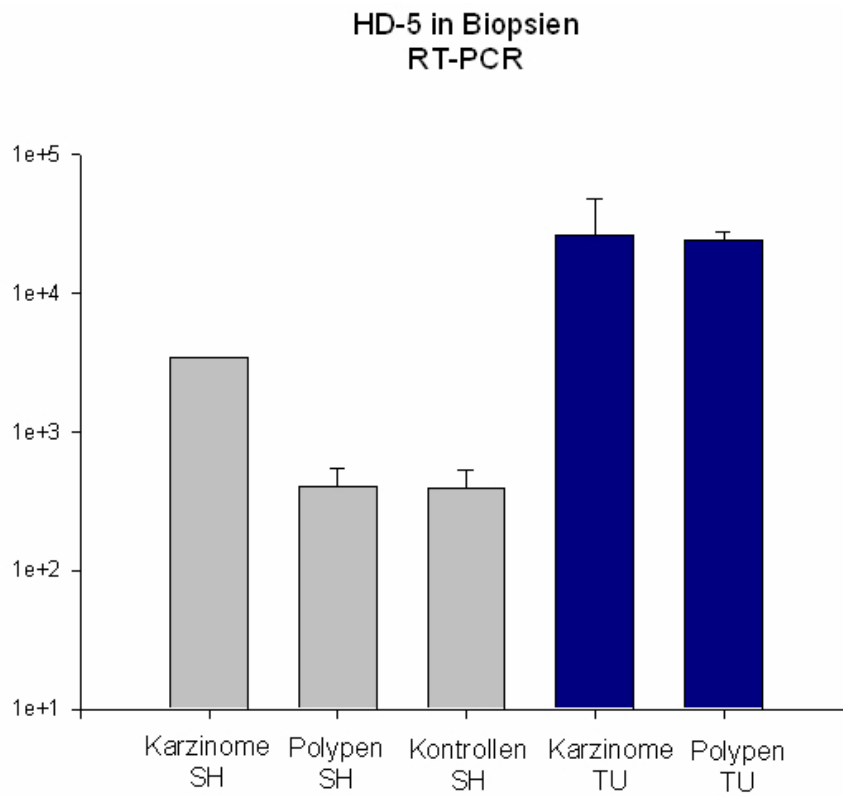
Das humane β -Defensin HBD-2 konnte zwar in Karzinomen vermehrt nachgewiesen werden, aufgrund der ausgeprägten Streuung der Werte ist das Ergebnis allerdings nicht signifikant. Der Mittelwert lag bei 1,9 mit einer Standardabweichung von 1,8.

HBD-2 in Biopsien RT-PCR



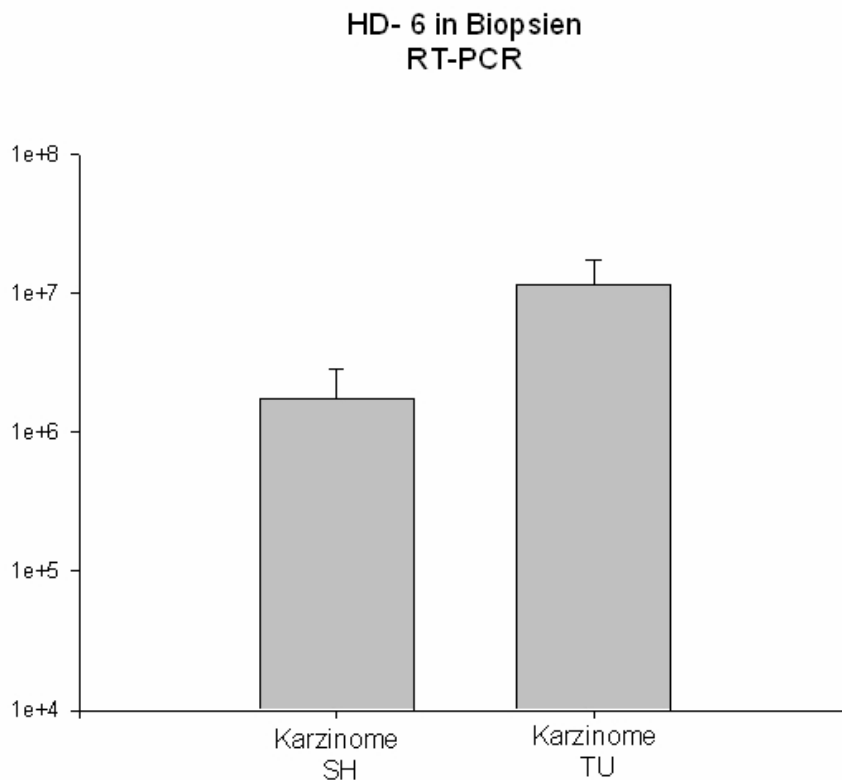
Grafik 2: HBD-2 Expression in der RT-PCR in kolorektalen Biopsien. Es handelt sich um einen relativen Vergleich. Die Skala wurde logarithmisch gewählt.

Die HD-5 Expression war in den Tumoren jeweils höher, als in den makroskopisch unauffälligen Schleimhautproben zu messen. Da die Werte aber stark schwankend waren, sind die Unterschiede auch hier nicht signifikant.



Grafik 3: HD-5 Expression in der RT-PCR in kolorektalen Biopsien. Es handelt sich um einen relativen Vergleich. Die Skala wurde logarithmisch gewählt.

Aus organisatorischen Gründen konnte HD-6 leider lediglich in Karzinomen und in der Tumorbenachbarten gesunden Schleimhaut gemessen werden. Auch hier war die Abweichung zu hoch, um signifikante Unterschiede messen können.



Grafik 4: HD-6 Expression in der RT-PCR in kolorektalen Karzinom- Biopsien. Es handelt sich um einen relativen Vergleich. Die Skala wurde logarithmisch gewählt.

3.3 Calprotektin

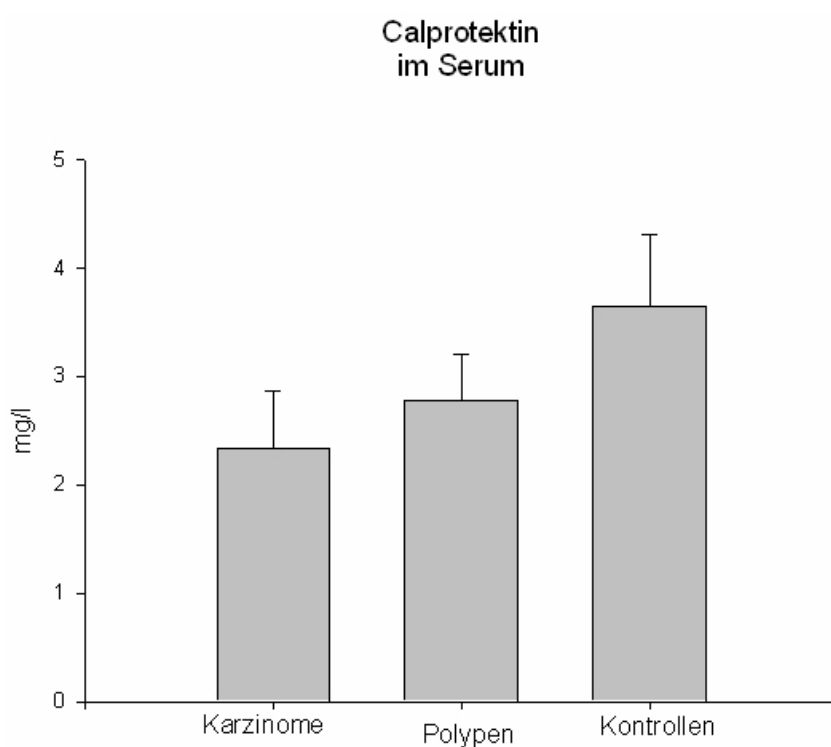
Der Entzündungsmarker Calprotektin wurde sowohl im Serum als auch in den Biopsien erkrankter Patienten und gesunder Kontrollen quantitativ per ELISA gemessen. Zusätzlich wurde in der Tumor- und Adenomgruppen eine Immunhistochemie mit semiquantitativer Auszählung der positiven Zellen pro Zählfeld durchgeführt.

3.3.1 Bestimmung der Calprotektin-Proteinkonzentration in Serum und Gewebe mittels ELISA

Im Serum zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Kollektiven. So lag der Wert für Karzinompatienten bei $2,3 \text{ mg/l} \pm 0,5$ (SEM), für Patienten mit Polypen bei $2,8 \text{ mg/l} \pm 0,4$ (SEM) und bei den Kontrollprobanden bei $3,6 \text{ mg/l} \pm 0,6$ (SEM). Die Werte sind der Tabelle 15 zu entnehmen und Grafik 5 aufgetragen.

Calprotektin im Serum	Karzinomgruppe	Adenomgruppe	Kontrollgruppe
mg/l	$2,3 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,6$

Tabelle 15: Calprotektin im Serum in mg/l. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.



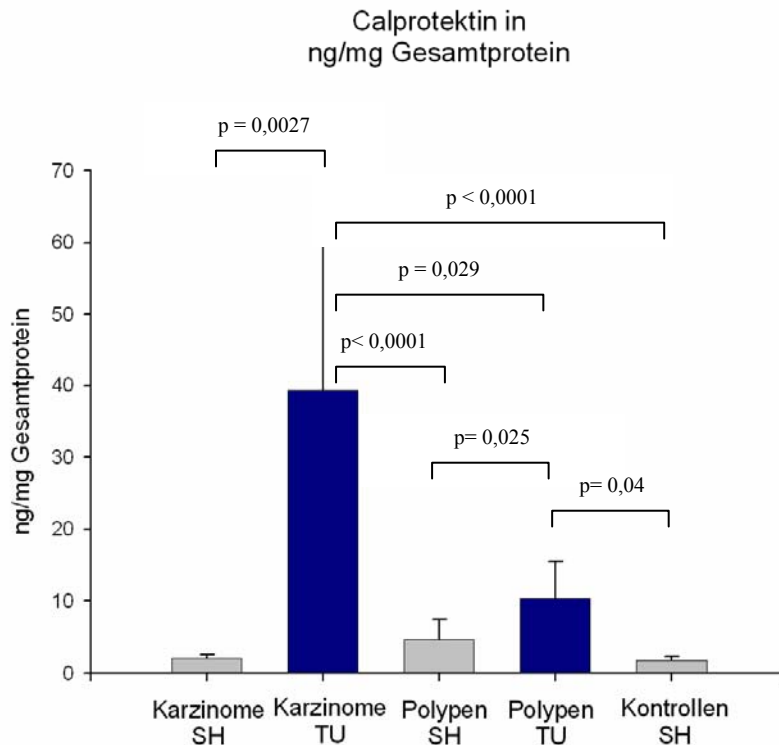
Grafik 5: Auf der Ordinate aufgetragen ist das Calprotektin im Serum in mg/l. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, die Werte entsprechen denen aus der oben stehenden Tabelle 15.

Zusätzlich wurde der Calprotektin Gehalt bezogen auf das Gesamtprotein in den Biopsien gemessen. Wie Grafik 6 veranschaulicht, zeigten hier sich deutliche Unterschiede in und innerhalb der einzelnen Gruppen. In den neoplastisch veränderten Gewebeprobe n war im Vergleich zu dem makroskopisch unauffälligen Gewebe mehr Calprotektin nachzuweisen. Bei der Karzinomgruppe war dies mit $p = 0,0027$, in der Polypengruppe mit $p = 0,025$ signifikant. Auch die einzelnen Gruppen wiesen untereinander Unterschiede auf. Im Vergleich zu den Kontrollbiopsien war in den Karzinomen eine vermehrte Calprotektinexpression nachzuweisen, der Unterschied war mit $p < 0,0001$ sehr hoch signifikant. Auch im Vergleich zu der Adenomgruppe waren die Werte in der neoplastischen Schleimhaut der Karzinome signifikant höher. Zur Adenomschleimhaut selber war es mit $p = 0,029$ signifikant, im Vergleich zur Tumorbenachbarten Schleimhaut mit $p < 0,0001$ hoch signifikant. Im Vergleich zu den Adenomen waren in den Kontrollen signifikant niedrigere Werte zu messen ($p = 0,04$).

Zwischen den einzelnen gesunden Schleimhautproben der 3 Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

	Karzinomgruppe		Adenomgruppe		Kontrollgruppe
Gewebe	SH	TU	SH	TU	SH
Calprotektin in ng/ml Gesamtprotein	2,1 ± 0,5	39,3 ± 26	4,7 ± 2,8	10,4 ± 5,1	1,8 ± 0,6

Tabelle 16: Calprotektin in kolorektalen Biopsien ng/ml Gesamtprotein.(Mittelwert mit SEM)



Grafik 6: Calprotektin-Konzentration im Gewebe bezogen auf den Gesamtproteingehalt in mg/l, die Ordinate hat daher keine Einheit.

3.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Calprotektin im Gewebe und die Assoziation zur Granulozyteninfiltration

Wie im Material- und Methodenteil bereits erwähnt, ergab sich bei dieser Analyse das Problem, dass für eine ausreichende semiquantitative Auswertung die Biopsiepräparate nicht ausreichend waren. Aufgrund der besseren Beurteilbarkeit und Morphologie eines gesamten Präparates und der Notwendigkeit einen größeren Bezirk mit mehreren (10) Zählquadraten auswerten zu können wurden daher nur die histopathologischen Präparate der Patienten nach Polypektomie und Kolektomie genutzt. Aus diesem Grunde konnte nur die normale und neoplastische Schleimhaut der Patienten mit Kolonkarzinom als auch die neoplastische Schleimhaut der Patienten mit Adenom ausgewertet werden. Dabei zeigte sich ein deutlich häufigerer und signifikant höherer Anteil positiver Zellen sowohl im Tumor als

auch im Polypengewebe (siehe Tabelle 17). Zusätzlich zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zur Granulozyteninfiltration. Diese war in allen Gruppen nachweisbar ($r = 0,89$, $p = 0,0001$, Spearman Korrelation).

Im Normalgewebe waren die positiven Zellen für Calprotektin einzeln im Stroma im Bereich der Submukosa eingestreut, dabei war hier nur ein Teil der Granulozyten positiv (siehe Abbildung 3 - 6).

	Adenomgruppe	Karzinomgruppe		P-Wert
Gewebe	TU	SH	TU	
Calprotektin (positive Zellen/Zählfeld)	67 ± 20^2	18.8 ± 4.3	85 ± 21^1	0.0007^1 0.003^2

Tabelle 17: Semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie für Calprotektin und Granulozyten (positive Zellen pro Zählfeld, Wert als Mittelwert \pm Standardabweichung), ¹ Mann-Whitney Test für neoplastische versus normale Schleimhaut in der Karzinomgruppe, ² Mann-Whitney Test für Adenom versus normale Schleimhaut der Karzinomgruppe.

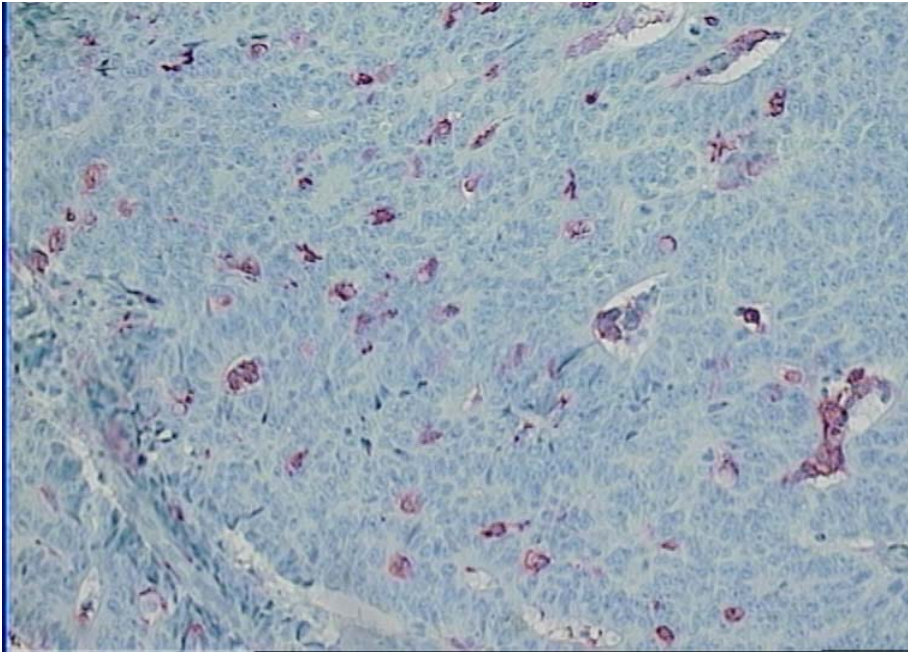


Abb. 3: Immunohistochemie eines kolorektalen Karzinoms. Dargestellt ist die erhöhte Calprotektinexpression mittels APAAP-Färbung (rötlich), Vergrößerung 1:100.

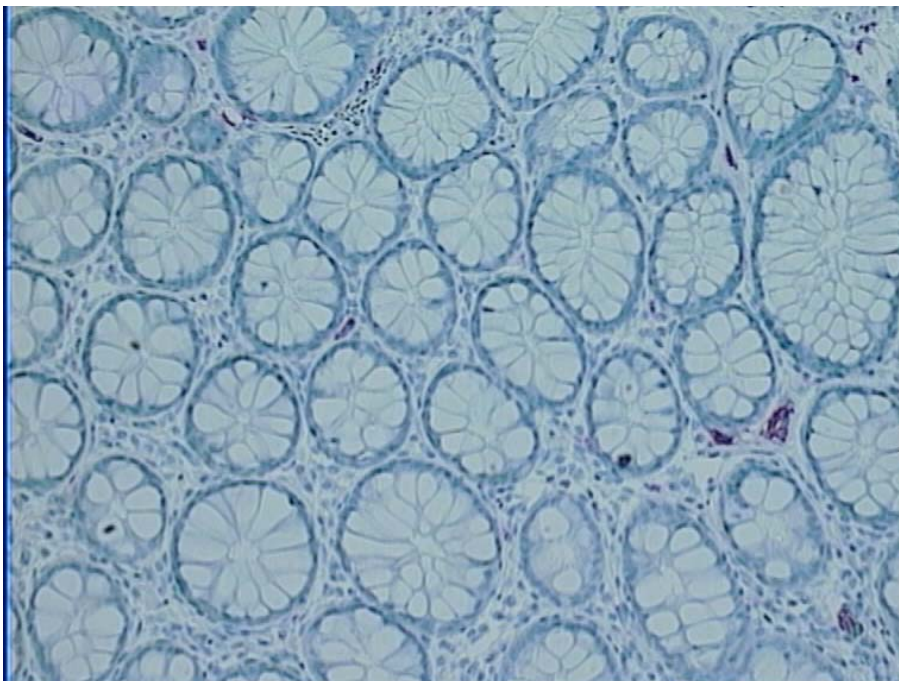


Abb. 4: Immunohistochemie kolorektaler Normalschleimhaut. Vergrößerung 1:400.

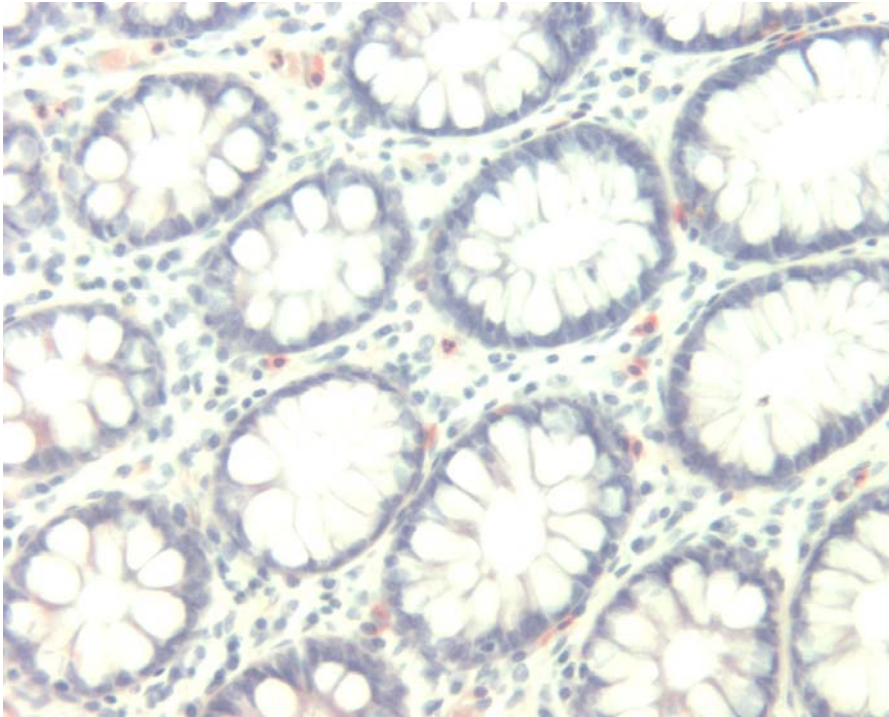


Abb.5: Granulozyten (Esterasefärbung) in kolorektalem Gewebe, Vergrößerung 1:1000.

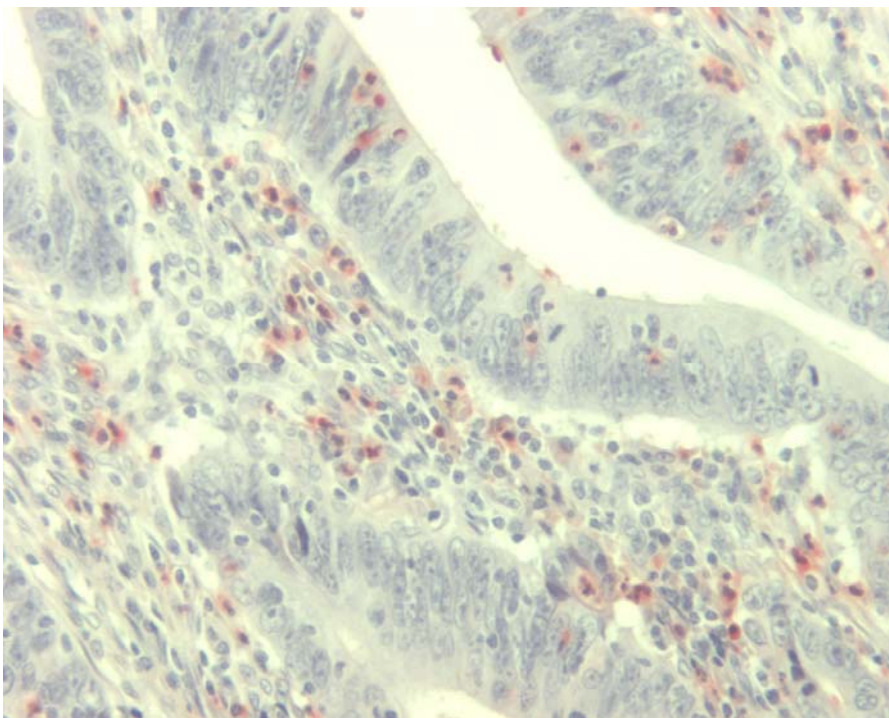


Abb.6: Granulozyten (Esterasefärbung) in kolorektalem neoplastischem Gewebe, Vergrößerung 1:400.

Die Abbildungen 3-6 zeigen exemplarisch Calprotektin und Granulozyten in malignem und gesundem kolorektalem Gewebe.

Immunhistochemisch zeigte sich eine Calprotektin-Reaktivität hauptsächlich in Granulozyten und Makrophagen und nur vereinzelt in epithelialen Zellen.

3.3 Entzündungsmarker

3.3.1 *Limulus Amöbozyten Lysat* Test (LAL- Test)

Da sich die vorliegende Arbeit mit möglichen Zusammenhängen zwischen entzündlichem Geschehen und Karzinogenese des KRK befasst, sollten Patienten mit einer schweren Allgemeinentzündung ausgeschlossen werden. Wir führten daher bei allen Probanden den *Limulus Amöbozyten Lysat*-Test durch. Als Positiv-Kontrolle wurden Seren von Sepsispatienten getestet. Keines der Seren der Probanden wies ein positives Ergebnis auf. Damit konnte ein Ausschluss einer allgemeinen schweren Entzündung bei allen Probanden erfolgen (Daten nicht aufgeführt).

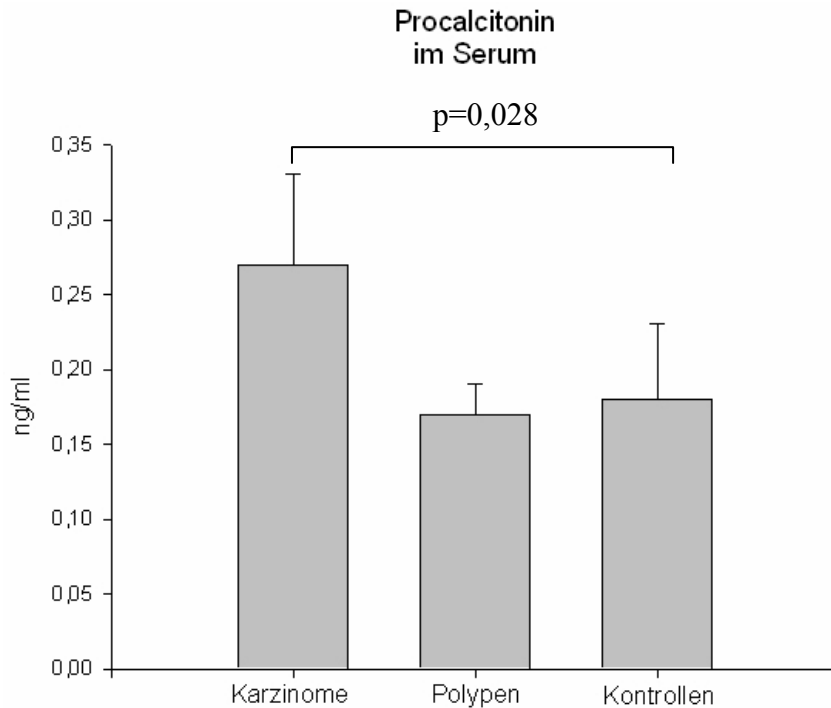
3.3.2 Procalcitonin (PCT)

Als weiteren allgemeinen Entzündungswert bestimmten wir Procalcitonin.

Wir konnten tendenziell bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom Procalcitonin in leicht höherer Konzentration nachweisen. Dies wurde allerdings im Wesentlichen durch bei 2 Patienten stark erhöhte Werte bedingt.

Procalcitonin war im Vergleich zu den Kontrollen signifikant in der Karzinomgruppe mit $p = 0,028$ erhöht zu messen.

Im Mittel lag der Wert bei den Karzinompatienten bei $0,27 \pm 0,06$ ng/ml (SEM), in der Polypengruppe bei $0,17 \pm 0,02$ ng/ml (SEM) und bei den gesunden Kontrollen bei $0,18 \pm 0,05$ ng/ml (SEM) (Referenzwert 0,05 ng/ml). Grafik 7 veranschaulicht diese Ergebnisse.

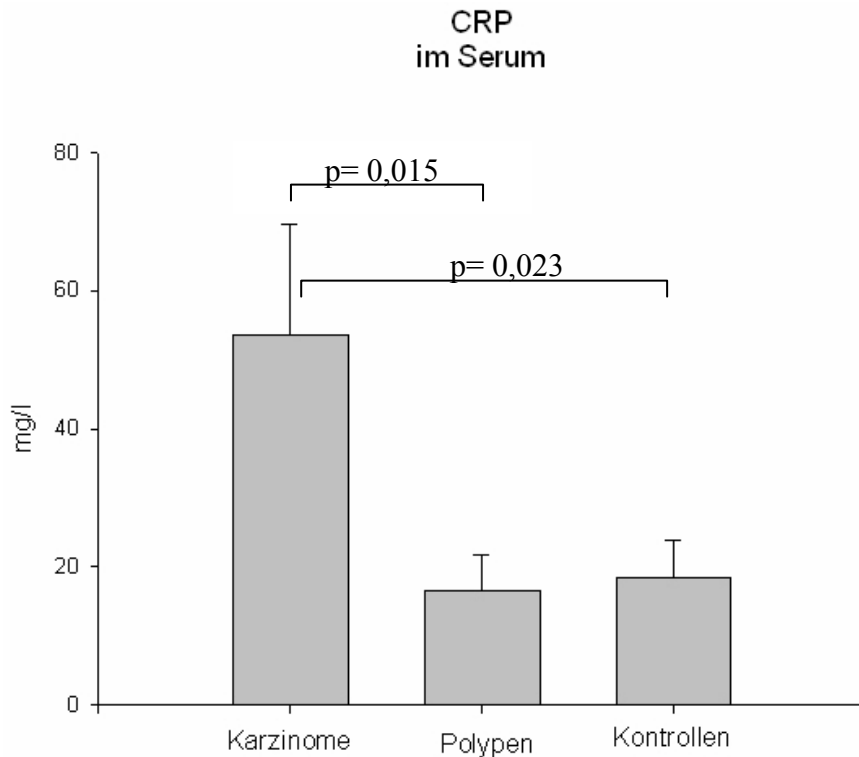


Grafik 7: Procalcitonin im Serum in ng/ml

3.3.3 C-reaktives Protein (CRP)

Auch für CRP zeigte die Karzinomgruppe signifikant höhere Werte. Bei Karzinompatienten war ein mittlerer Wert von $53,6 \pm 16$ mg/l, bei Patienten mit Polypen von $16,6 \pm 5,11$ mg/l und bei den Kontrollpatienten von $18,5 \pm 5,4$ mg/l zu messen (Referenzwert: < 5 mg/l).

Im Vergleich der Karzinompatienten zu Patienten mit Polypen ergab sich eine Signifikanz von $p = 0,015$, im Vergleich zu den Kontrollen von $p = 0,023$. Keine Signifikanz war zwischen der Polypen- und der Kontrollgruppe auszumachen. In Grafik 8 sind die Ergebnisse mit den Signifikanzen dargestellt.



Grafik.8: CRP im Serum in mg/l

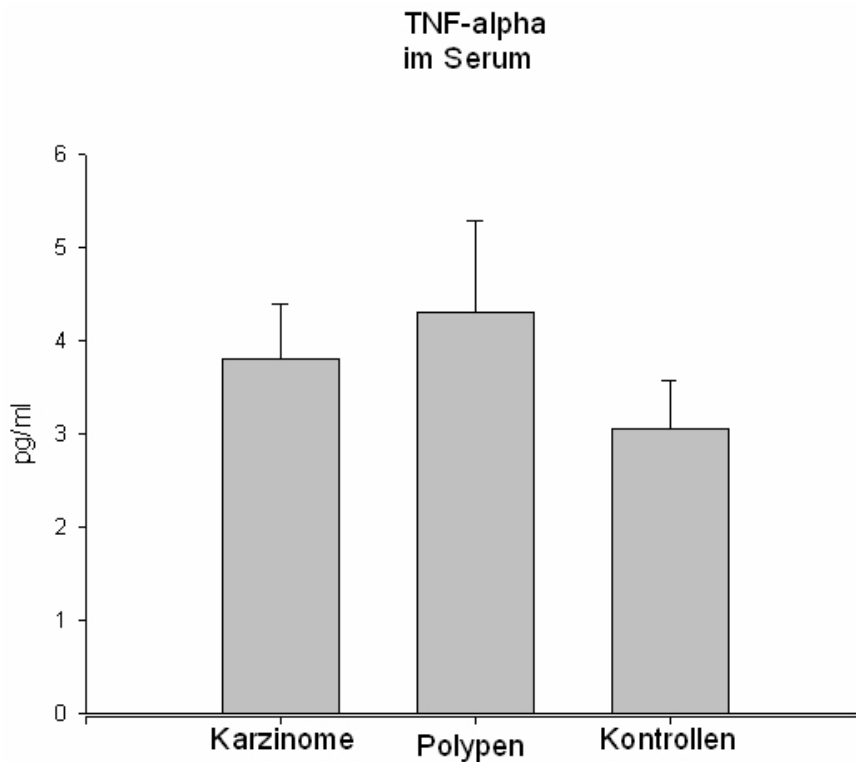
3.4 Weitere im Serum zu messende Parameter (TNF- α und Albumin)

3.4.1 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Auch TNF- α war in allen 3 Gruppen in annähernd gleicher Konzentration zu messen. (Referenzwert 1,2 - 15,3 pg/ml). Tabelle 18 und Grafik 9 zeigen die von uns erhobenen Werte.

TNF- α im Serum	Karzinomgruppe	Adenomgruppe	Kontrollgruppe
pg/ml	3,8 \pm 0,6	4,3 \pm 1	3,1 \pm 0,5

Tabelle 18: TNF- α im Serum in pg/ml (Mittelwert mit SEM)



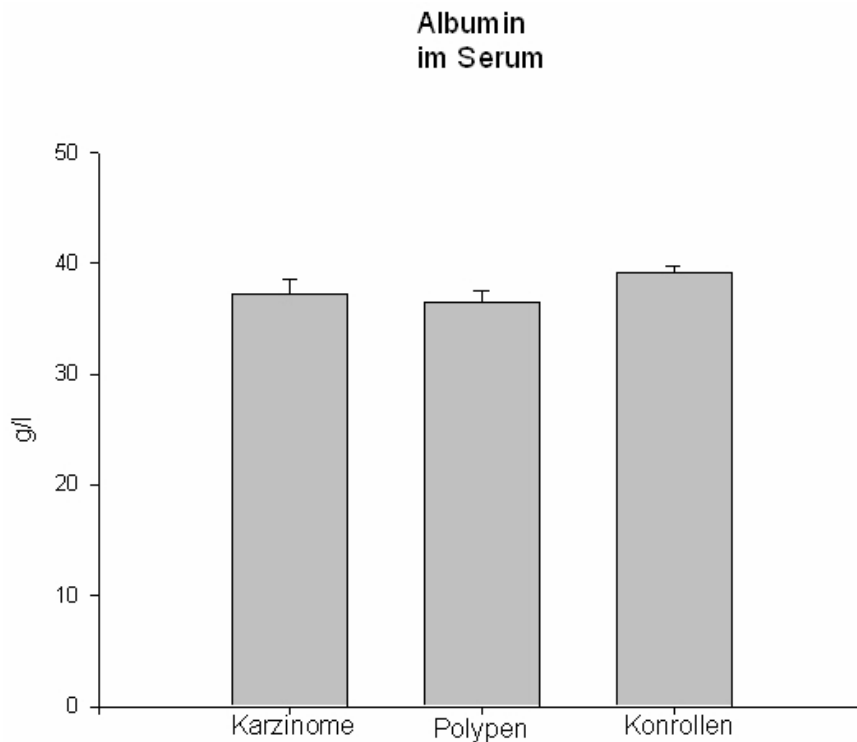
Grafik 9: TNF- α im Serum in pg/ml

3.4.2 Albumin

Albumin war in allen 3 Gruppen normwertig (Karzinomgruppe: 37,3 g/l \pm 1,3; Polypengruppe: 36,4 g/l \pm 1; Kontrollgruppe: 39,1 g/l \pm 0,6 (Referenzwert: 33 - 55 g/l). Die Ergebnisse sind in Grafik 10 und Tabelle 19 aufgeführt.

Albumin im Serum	Karzinomgruppe	Adenomgruppe	Kontrollgruppe
g/l	37,3 \pm 1,3	36,4 \pm 1	39,1 \pm 0,6

Tabelle 19: Albumin im Serum in g/l. (Mittelwert mit SD)



Grafik 10: Albumin im Serum in g/l

Für Albumin und TNF- α konnten keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen gefunden werden.

3.5 Tumormarker

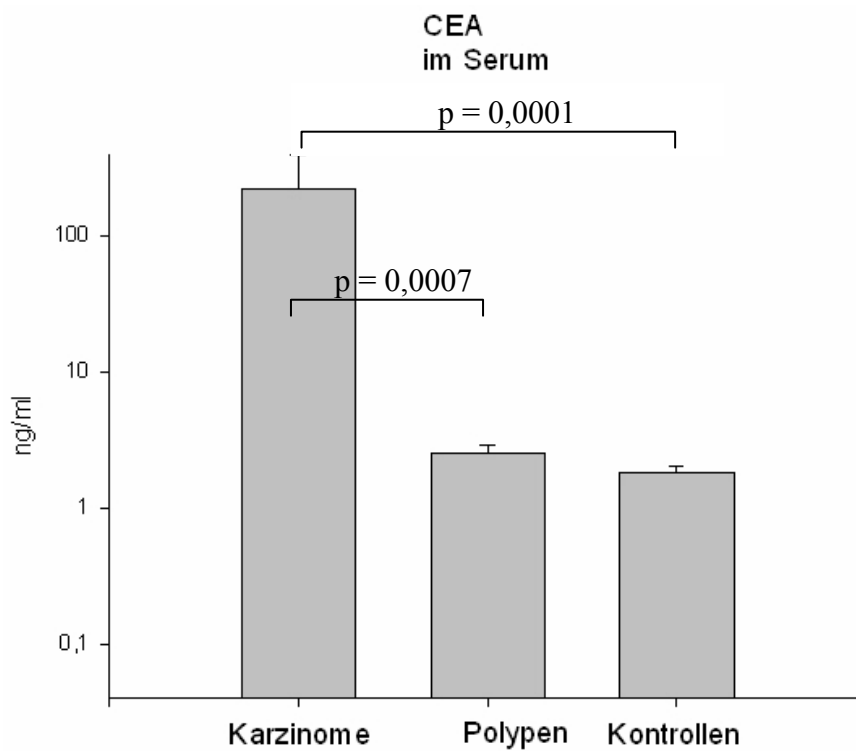
3.5.1 Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Als anerkannter Tumormarker wurde CEA im Serum ermittelt. Bei den Karzinompatienten war ein signifikant höherer Wert zu messen, der bei $221,7 \pm 169,8$ ng/ml lag. Im Vergleich zu Patienten mit Adenomen war eine Signifikanz von $p = 0,0007$ zu erheben. In der Adenomgruppe lag der mittlere Wert bei $2,5 \pm 0,4$ ng/ml. Bei den gesunden Kontrollen lag der CEA- Wert noch niedriger bei $1,8 \pm 0,2$ ng/ml. (Referenzwert: $< 4,6$ ng/ml) Die Werte waren hochsignifikant niedriger als bei den Karzinompatienten ($p = 0,0001$). Ein Assoziation von erhöhtem CEA zu

mukosaler oder systemischer Entzündung besteht nach unseren Daten nicht und kann den unterschiedlichen interindividuellen prädiktiven Wert von CEA nicht erklären.

Carcinoembryonales Antigen Serum	Karzinomgruppe	Adenomgruppe	Kontrollgruppe
ng/ml	221,7 ± 169,8	2,5 ± 0,4	1,8 ± 0,2

Tabelle 20: Carcinoembryonales Antigen (CEA) im Serum in g/l.(Mittelwert mit SEM)



Grafik 13: CEA im Serum in ng/ml

4 Diskussion

Bereits im Jahr 1863 ist von Virchow eine Assoziation zwischen Karzinogenese und entzündlichen Vorgängen postuliert worden (Balkwill 2001). Heute ist für zahlreiche Karzinomleiden ein Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen gesichert. Neben dem Magenkarzinom sind an dieser Stelle auch das Dickdarm-, Leberzell- und Harnblasenkarzinom zu nennen (Welton 1979). Teils konnte dabei auch ein eindeutiger Zusammenhang zu Infektionen mit Bakterien und Viren hergestellt werden. Im Falle des Magenkarzinoms ist hier *Helicobacter pylori* zu nennen. Die erste Beschreibung des wichtigen Zusammenhangs zwischen Karzinogenese und onkogenen Viren ist durch Gallo et al. erfolgt, viele weitere Beschreibungen folgten (Blayney 1983; Morris 1995). Für das Zervixkarzinom werden beispielsweise die Papillomaviren (HPV 16 und 18) heutzutage als einer der wesentlichsten Risikofaktoren mit verantwortlich gemacht.

Für das kolorektale Karzinom postulierte Swidsinski et al. 1998 erstmals einen möglichen Zusammenhang zwischen bakterieller Infektion und Karzinogenese. In dieser Studie konnten die Wissenschaftler *E. coli* vermehrt intrazellulär in der Schleimhaut von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom nachweisen (Swidsinski 1998). In 30 von 31 asymptomatischen und in 24 von 34 symptomatischen Kontrollen konnten sie keine intrazelluläre Bakterienbesiedelung feststellen. Hingegen wurde bei 55 von 60 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom bzw. Adenomen eine hohe *E. coli* Konzentrationen gemessen. Der Unterschied dieser beiden Gruppen war signifikant. Makroskopisch unauffälliges Gewebe war bei 52% der Adenom- und bei 84% der Karzinompatienten ebenfalls besiedelt. Ob die gefundene Assoziation kausal hinsichtlich war oder dies lediglich Ausdruck einer gestörten mukosalen Barriere ist, bleibt letztlich unklar.

Unterschiedlich sind die Pathomechanismen, über die Bakterien und Viren karzinogen wirken. Während beispielsweise für einige Viren die Mechanismen schon sehr genau erforscht sind (so wirken beispielsweise die humanen Papillomaviren 16 und 18 assoziierten Proteine E6 und E7 über die Komplexierung

von zellulären Tumorsuppressorgenen), so sind die Mechanismen für Krankheiten, die mit chronisch bakterieller Entzündung assoziiert sind (chronische Cholezystitis, Magenkarzinom), größtenteils noch unverstanden. So scheint es hier zum wesentlichen Teil eher die Entzündungsantwort des Körpers auf eine bakterielle Infektion zu sein, die die Karzinogenese fördert. Dies scheint auch für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, eines der meist beforschten Gebiete in diesem Kontext, zuzutreffen.

Entzündungszellen haben großen Einfluss auf die Tumorentstehung. Es gibt Evidenz dafür, dass Entzündungszellen während der Frühphase des neoplastischen Prozesses als starker Promotor wirken. Sie schaffen ein attraktives Milieu für das Tumorwachstum, indem sie beispielsweise die genomische Instabilität sowie Lymphangiogenese und die Angiogenese fördern. Die Entzündungszellen, Chemokine und Zytokine beeinflussen das gesamte Tumororgan, regulieren das Wachstum, die Migration und Differenzierung aller Zelltypen, einschließlich neoplastischer, fibroblastischer und epithelialer Zellen. In der späteren Tumorgenese unterhalten Tumorzellen inflammatorische Mechanismen wie Selektin-Liganden-Interaktionen, Matrix-Metallo-Proteinase-Produktion und chemotaktische Funktionen. Dies spielt eine Rolle bei der Tumorausdehnung und Metastasierung. Bei Tumorpatienten ist zudem eine gestörte Entzündungsreaktion beschrieben. Zum einen scheint die Regulierung der anti-entzündlichen Zytokine unzureichend, zum anderen kommt es zur Desensibilisierung von Rezeptoren durch hohe Chemokin- und Zytokinkonzentrationen (Coussens 2002).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal malignen Wachstums, die ungehemmte Zellproliferation, wird ebenfalls durch Entzündung beeinflusst. Man weiß heute, dass erhöhte Zellproliferation in einem Milieu, das reich an Entzündungszellen, Wachstumsfaktoren, aktiviertem Stroma und potentiell DNA-zerstörendem Agens ist, das Risiko zur malignen Entartung fördern kann. Dvorak verglich das Verhalten von tumorösem Gewebe mit einer nicht heilenden Wunde: Nach Gewebszerstörung kommt es im Rahmen der Wundheilung zur Zellproliferation, ist das Agens beseitigt bzw. die Wundheilung abgeschlossen, kommt es normalerweise zum

Stillstand der Entzündungsreaktion und Zellproliferation. Kommen aber DNA-zerstörende oder mutagene Prozesse hinzu, kommt es in Gegenwart von Entzündungszellen und Wachstumsfaktoren zur anhaltender Proliferation (Dvorak 1998).

Über 15% aller malignen Erkrankungen werden nach heutigem Wissen mit entzündlichen Vorgängen in Zusammenhang gebracht (Kuper 2000). Die Tatsache, dass die Einnahme von anti-inflammatorischen Medikamenten wie Aspirin zu einer Senkung des Krebsrisikos führen, spricht ebenfalls für einen engen Zusammenhang (Baron 2003). Dies ist besonders eindrucksvoll insbesondere für die Kolorektalkarzinome gezeigt worden. Unter Berücksichtigung der bereits in der Einleitung aufgeführten Erkenntnissen sowie der überragenden epidemiologischen Evidenz des deutlich erhöhten Krebsrisikos in Patienten mit chronisch entzündliche Darmerkrankungen ist dies hinweisend darauf, dass möglicherweise gerade im Kolon die chronische Entzündung einen Risikofaktor für Entwicklung eines sporadischen KRK darstellen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige möglichen Bindeglieder und Marker eines Zusammenhangs zwischen entzündlichem Geschehen und der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms untersucht. In den nachfolgenden Abschnitten sollen die in der Fragestellung aufgeworfenen Punkte der in dieser Arbeit untersuchten Proteine und Marker im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert werden.

4.1 Defensine

Die Oberflächen der Schleimhaut besitzen ein angeborenes unspezifisches Abwehrsystem. Dieses besteht aus einer Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden und stellt im Ergänzung der epithelialen Schrankenfunktion zusätzlich einen wichtigen Teil der unspezifischen Abwehr dar. Antimikrobielle Peptide, zu denen die Defensine zählen, werden in Körperflüssigkeiten wie die Lymphe abgegeben, kommen in phagozytosefähigen Zellen vor und werden auf Schleimhautoberflächen freigesetzt (Hecht 1999).

Defensine werden in zahlreichen Organen und Organsystemen wie Lunge, Haut, Augenepithel, Urogenitaltrakt und Gastrointestinaltrakt nachgewiesen (Fellermann 2001). Es handelt sich um kationische, argininreiche Moleküle mit einem im Mittel recht niedrigen Molekulargewichtes von 3-5 kDa, die aus 28-44 Aminosäuren bestehen und eine typische Tertiärstruktur mit drei antiparallelen β -Faltblättern besitzen, die durch Schleifen und eine β -Haarnadel verbunden sind. Es sind bis heute die α -Defensine Humanes Neutrophiles Peptid (HNP) 1-4 und Humanes Defensin (HD) 5-6 beschrieben. An β -Defensine sind Humanes Beta Defensin (HBD) 1-4 (Fellermann 2001; Garcia 2001; Harder 2000; Lehrer 1999) beschrieben. Auf menschlichen Schleimhäuten konnten bisher HD-5-6 und HBD-1-3 nachgewiesen werden (Frye 2000; Harder 2001). HNP-1-4 kommen bevorzugt in menschlichen Granulozyten vor, wo sie 10% der gebildeten Proteine ausmachen (Ganz 1999). In tierischen Zellen ist zuvor bereits ein Anteil von über 5% Defensinen am Gesamtprotein nachgewiesen worden (Lehrer 1991).

Aufgrund ihrer polaren Molekülstruktur können Defensine in Phospholipidmembranen eindringen und entweder allein oder nach Bildung eines Komplexes Poren bilden (Lehrer 1989). Es wird postuliert, dass der geringere Anteil anionischer Phospholipide in Membranen von Eukaryonten diese vor einer Schädigung durch Defensine schützt (Ganz 1999).

HBD-1, das in geringer Menge konstitutiv exprimiert wird (Zhao 1996), wirkt bakterizid gegen Gram-negative Bakterien (Hecht 1999). Die Bildung von HBD-2 ist dagegen induzierbar und kommt nicht regelhaft vor (Diamond 1996, Tarver 1998). Es wird durch Bakterien, Hefen sowie proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β induziert. Es wirkt bakterizid gegen Gram-negative Bakterien und *Candida albicans* und bakteriostatisch gegen Gram-positive Bakterien (Schröder 1999). HBD-3 ist ebenfalls induzierbar und wirkt bakterizid gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Auch HBD-3 ist gegen *Candida albicans* wirksam (Harder 2001; Schibli 2002). Eine starke antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus carnosus* und *Pseudomonas aeruginosa* ist für HBD-4 nachgewiesen. In vitro ist es durch Gram-positive und -negative Bakterien und

besonders durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einen Proteinkinase-C-Stimulator, induzierbar, nicht aber durch IL-1 α , IL-6, Interferon γ und TNF- α (Garcia, 2001).

Die humanen epithelialen α -Defensine HD-5 und -6 besitzen ein breites bakterizides und fungizides Wirkspektrum (Bevins 1999). Für das rekombinante HD-5 konnte eine Wirkung gegen *Listeria monocytogenes*, *Escherischia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Candida albicans* nachgewiesen werden (Martin-Porter 1997).

Antimikrobielle Peptide sind ein zentrale Bestandteil der unspezifischen Abwehr des Menschen. Dies gilt insbesondere für chronisch entzündliche Darmerkrankungen und hier vor allem für die Colitis ulcerosa. Ein zytotoxischer Effekt von Defensinen konnte bereits nachgewiesen werden (Lehrer 1993).

In der vorliegenden Arbeit ergaben die Expressionsanalysen der humanen Defensine HBD-1, -2 und HD-5 keine signifikanten Unterschiede. HBD-2 war als induzierbares Defensin nur in wenigen Fällen vorhanden, eine eindeutig regelhafte Über- oder fehlende Expression konnte weder auf mRNA noch auf Proteinebene in den malignen Geweben oder in den benachbarten Schleimhäuten gefunden werden. HBD-1 und HD-5 konnten in geringer Menge in allen 3 Gruppen nachgewiesen werden. Die immunhistochemischen Färbungen ergaben ebenfalls kein eindeutig unterschiedliches Bild. Alle Defensine waren in den beschreiben Regionen ohne regelhafte Überexpression nachweisbar. In der aktuellen Literatur gibt es über die Expressionsanalysen an Kolorektaltumoren keine vergleichbaren Daten. Nur für den oberen Gastrointestinaltrakt sind einige Daten vorhanden. Dabei decken sich die bei uns gefunden Ergebnisse einer nicht veränderten Expression mit der Literatur. In einer Arbeit von 2003 konnten erhöhte HBD-2-Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Yoshimoto 2003). Ansonsten ist im Kolon für HBD-1 eine geringe, aber bei allen Patienten vorhandene Expression vorbeschrieben. Ob die bei uns beobachtete etwas erniedrigte HBD-1 mRNA Expression eine funktionelle Bedeutung hat, ist eher fraglich, da wir zumindest mit der Immunhistochemie kein grob verändertes Expressionsmuster auf Proteinebene feststellen konnten.

HBD-2 ist wie in der Literatur beschrieben nur selten nachweisbar. Diese Ergebnisse weisen, wie oben beschrieben, auf eine konstitutive Bildung von HBD-1 hin, während HBD-2 im Rahmen einer Entzündung induziert wird. Die inkonsistente HBD-2-Expression in unserer Studie ist vermutlich ohne Bedeutung. Bei den α -Defensinen HD-5 und -6 wird in der Literatur ein uneinheitliches Expressionsmuster beschrieben. In unseren Färbungen konnten in den einzelnen Gruppen für HD-5 ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen Adenom vs. KRK festgestellt werden.

Zusammenfassend legen unser Ergebnisse nahe, dass weder in den tumorbenachbarten Schleimhäuten, noch in prämaligener und maligner Kolonschleimhaut eine veränderte Expression der untersuchten Defensine nachweisbar ist. Bei CED-Patienten ist ein verändertes Defensinmuster nachzuweisen. Damit besteht die Möglichkeit, dass vermehrt Bakterien die Schleimhaut penetrieren können. Somit ist diese veränderte Defensinexpression potentiell kausal am Krankheitsprozeß der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt. Dass eine veränderte Penetration mit Bakterien auch bei Patienten mit Kolorektalkarzinomen möglich ist, konnte durch Swidsinki *et al.* gezeigt werden. Unsere Ergebnisse legen allerdings eine kausale Beteiligung der Defensin an diesem Prozess nicht nahe.

4.2 Calprotektin

Ein neuerer Entzündungsmarker bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist das Calprotektin. In der Gastroenterologie hat sich die Messung fäkalen Calprotektins, ein mit Entzündungen assoziierter Heterodimer-Komplex aus Zink-bindenden und zwei Kalzium-bindenden Proteinen (S100A8/S100A9) mit antimikrobiellen Eigenschaften, insbesondere bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung etabliert (Poullis 2003). Es handelt sich hauptsächlich um ein myelomonozytäres Protein, das annähernd 5% des Gesamtproteingehalts in neutrophilen Granulozyten ausmacht und von

Neutrophilen, Monozyten und Keratinozyten gebildet wird (Fagerhol 1980). Die antimikrobiellen Fähigkeiten dieses Proteins scheinen auf die zinkbindenden Eigenschaften zurückzuführen sein (Hahn 1995).

Zahlreiche entzündliche Vorgänge können zu erhöhten Werten führen (Yui 2003). Mäßig erhöhte Werte > 50 mg/l können bei gastrointestinalen Infekten und stark erhöhte Werte bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Stuhl gemessen werden, wohingegen Werte < 50 mg/l bei Gesunden und bei Patienten mit funktionellen Darmstörungen vorkommen. Die Konzentrationsunterschiede im Stuhl dienen somit der Differenzierung zwischen funktionellen und entzündlichen Darmerkrankungen. Da Calprotektin während der Darmpassage nicht abgebaut wird und es in Stuhl sehr stabil ist, können auch Entzündungen im oberen Darmtrakt nachgewiesen werden. Die Bedeutung des fäkalen Calprotektins in der Gastroenterologie ist vor allem im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen erforscht. Die Calprotektin-Messung wird seit Kurzem in einzelnen Zentren in Großbritannien und Norwegen routinemäßig durchgeführt (Poullis 2003). Erhöhte Stuhlwerte können aber auch bei Karzinomleiden gefunden werden. So ist in vielen Studien Calprotektin in der Mehrzahl der Fälle im Stuhl von Patienten mit kolorektalem Karzinom deutlich erhöht nachweisbar gewesen (Yui 2003).

Ein direkter Vergleich von okkultem Blut im Stuhl und Messungen von fäkalem Calprotektin zur Erkennung von KKR und Adenomen zeigte zwar eine höhere Sensitivität (79% vs. 43%), aber eine geringere Spezifität (72% vs. 92%) für Calprotektin (Tibble 2001). Seine Tauglichkeit als Screeningparameter ist noch fraglich, da die meisten Studien mit Patienten mit bereits vordiagnostizierten tumorösen Veränderungen oder bekanntem Risiko durchgeführt wurden (Poullis 2003). Neuere Studien legt allerdings nahe, dass Calprotektin nur einen begrenzten Wert in der Krebserkennung hat (Hoff 2004; Limburg 2003). Nach ihrer Datenlage sind Sensitivität mit 37% und Spezifität mit 63% weitaus geringer.

Seine Rolle bei der Krebsfrüherkennung ist dementsprechend noch nicht hinreichend untersucht, ist aber Gegenstand der Forschung. Nicht nur das fäkale, sondern auch das Plasmacalprotektin weist auf entzündliche Vorgänge im Körper

und organische Erkrankungen hin. Erhöhte Werte sind nach John *et al.* auf einen vermehrten Zellumsatz der myelomonozytischen Zellen im Körper zurück zu führen (John 1997). Fagerhol *et al.* stellten 1985 eine Studie vor, nach der bei Patienten mit neudiagnostiziertem Lungenkarzinom ein erhöhter Calprotektin Gehalt im Plasma festgestellt werden konnte (Fagerhol 1985). Kristinsson *et al.* konnten dann 1998 ein erhöhtes Calprotektin in der Mehrzahl der Fälle im Stuhl von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachweisen (Kristinsson 1998). In ihrer Studie konnten sie zudem einen signifikant geringeren Plasmacalprotektin Gehalt bei KRK-Patienten im Stadium T1 und T2 als bei fortgeschritteneren Stadien zeigen.

Neben Messung im Stuhl und Plasma kann Calprotektin auch in Gewebeproben nachgewiesen werden. So konnten wir unsererseits erhöhte Spiegel in Biopsien aus Tumorgewebe von Patienten mit malignen Tumoren und Adenomen nachweisen. Tumorbenachbartes Normalgewebe und Biopsien von gesunden Probanden erbrachten signifikant niedrigere Werte. Immunhistochemisch zeigte sich bei unserer Arbeit eine Calprotektin-Reaktivität hauptsächlich in tumorinfiltrierenden Granulozyten und Makrophagen. Auffällig war dabei, dass nur ein Teil der Patienten deutlich erhöhte Werte zeigte.

In letzter Zeit sind weitere biologische Eigenschaften von Calprotektin aufgezeigt worden, die über das hinausgehen was bisher vermutet wurde, dass Calprotektin ein rein antientzündliches Protein ist. So konnte in einem Modell der Hautkarzinogenese gezeigt werden, dass Calprotektin hier teils überexprimiert wird und selber in einer c-FOS abhängigen Signaltransduktionskaskade durch Glukokortikoide runterreguliert wird. Dies ist hinweisend darauf, dass es offensichtlich tumorspezifische, noch unerkannte Eigenschaften von Calprotektin gibt (Gebhardt 2002).

In einer hochaktuellen Arbeit konnten dabei die tumorassoziierten Mechanismen weiter erarbeitet werden. So scheint Calprotektin, zumindest in diesem Modell der Hautkarzinogenese, tatsächlich auch recht spezifisch an der Inhibition der virusassoziierten Karzinogenese beteiligt zu sein. In diesem Modell mit Keratinozyten, die mit den bereits erwähnten Karzinogen induzierenden humanen

Papillomaviren 16 und 18 immortalisiert wurden, führte ein Behandlung mit externem Calprotektin zu einer Hypophosphorierung des onkogenen Protein E7, was zu einem Verlust der überschießenden Zellteilung und komplettem Zellzyklusarrest führte (Tugizov 2005). So besitzt Calprotektin offensichtlich tumorunterdrückende Eigenschaften. In einer weiteren Arbeit, hier an kolorektalen Zelllinien konnten apoptotische Mechanismen eindrucksvoll belegt werden. So scheint die Apoptose teils über die Generation von reaktiven oxidativen Spezies, teils über eine Bindung von Zink aus den Zielzellen vermittelt zu werden (Ghavami 2004).

In Kenntnis dieser zytotoxischen, zellzyklusarretierenden und apoptotischen Eigenschaften ist es nicht verwunderlich, dass in verschiedenen malignen Tumoren sowohl eine starke Über- als auch ein Verlust der Expression beschrieben ist. Dies gilt sowohl für Calprotektin als Heterodimer als aber auch insbesondere für die einzelnen Homodimieren S108A und S109A, eine Beobachtung die noch wenig gut verstanden ist (Wang 2004; Kong 2004; Ott 2003; Cross 2005; Shen 2004).

In Zusammenhang mit diesem Daten und den bekannten zytotoxischen und antiapoptotischen Eigenschaften von Calprotektin ist die vermehrte Expression in Tumorpatienten eventuell auch in einem anderen Zusammenhang zu sehen. So könnte die Expression in Granulozyten eines Kolorektalkarzinoms als eine mögliche Abwehrstrategie des Körpers gegenüber malignem Wachstums angesehen werden. Dafür sprechen unsere Ergebnisse, dass nur in malignen Geweben erhöhte Calprotektinwerte und nicht in gesundem Kontrollgewebe zu messen waren. Dafür spricht außerdem, dass Calprotektin nur in aktivierten Granulozyten vorhanden war und dass die Färbung immer an der Invasionsfront sichtbar war. Warum dies nur bei einem Teil der Patienten nachweisbar ist, bleibt unklar. Unsere Ergebnisse könnten die zum Teil sich widersprechenden Ergebnisse der Literatur erklären und warum Calprotektin als genereller Tumormarker teils sehr widersprüchliche Ergebnisse zeigt.

So gilt bis jetzt die Theorie, dass während der Leukozytenmigration das Calprotektin durch die Darmwand vermehrt ausgeschieden wird und somit erhöhte

Werte vor allem bei entzündlichen Geschehen gemessen werden können. Diese Theorie, dass erhöhte Werte auf eine erhöhte generellen Schleimhautdurchlässigkeit, einem „leaky gut“, zurückzuführen sind, scheint nach unseren Ergebnissen zumindest fraglich, da man in diesem Falle auch erhöhte Calprotektin-Werte in der tumorbenachbarten Schleimhaut erwarten würde. Vielmehr ist dieser Aspekt, dass Calprotektin einen tumorspezifischen Abwehrmechanismus darstellen könnte, hochinteressant und sollte Gegenstand weiterer Forschungen sein.

4.3 Sonstige Marker

Im nachfolgenden sollen die teils als entzündungsassoziierte, teils als tumorspezifische Komplex angesehen, von uns untersuchten systemischen Marker im Einzelnen diskutiert werden.

4.3.1 *Limulus Amöbozyten Lysat (LAL)*-Test

Beim LAL-Test handelt sich um eine Gel-Clot Methode, deren Ziel die quantitative Bestimmung von Endotoxinen Gram-negativer Bakterien ist. Eine Infektion mit Gram-positiven Bakterien wird laut Herstellerangaben ebenfalls nachgewiesen. Der Test beruht auf der Tatsache, dass es schon in Anwesenheit winziger Mengen von Pyrogenen zu einer Gelbildung zwischen diesen und dem *Limulus Amöbozyten Lysat* kommt. Dabei katalysieren Endotoxine die Aktivierung eines Proenzym im *Limulus Amöbozyten Lysat*. Das aktivierte Enzym hydrolysiert spezifische Bindungen in einem Gerinnungsprotein, welches im *Limulus Amöbozyten Lysat* vorkommt.

Mit Hilfe des LAL-Tests können Bakteriämien nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden. Wir führten den Test durch, um eine relevante Bakteriämie auszuschließen. In der Literatur sind vermehrte Bakteriämien und Sepsis bei Tumorpatienten beschrieben.

Nach unseren Daten konnten wir dies nicht reproduzieren. Die von uns erhobenen Daten legen vielmehr nahe, dass die erhöhten Entzündungswerte CRP und

Calprotektin nicht die Folge einer Bakteriämie sind. Es scheint unabhängig von einer systemischen bakteriellen Besiedlung zu Entzündungsreaktionen zu kommen. Auch dies ist ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von Entzündungen und Entzündungsmarkern in der Karzinogenese.

4.3.2 Procalcitonin (PCT)

Procalcitonin (PCT) ist ein aus 116 Aminosäuren aufgebautes und mengenmäßig das wichtigste Vorläuferpeptid des Calcitonins. Es ist im Plasma bzw. Serum gesunder Probanden nicht oder nur in geringer Konzentration nachweisbar, da es unter physiologischen Bedingungen intrazellulär einer proteolytischen Spaltung zu Calcitonin unterliegt. Bakterielle Endotoxine, sowie Pilze und Parasiten können die Synthese und Freisetzung von PCT induzieren. Die Serumkonzentrationen korrelieren mit dem Schweregrad der Entzündung (Assicot 1993).

Bei viralen, neoplastischen und Autoimmunerkrankungen konnte bis jetzt kein oder nur ein geringer Anstieg von PCT beobachtet werden (Rau 1997).

Bei unseren Messungen konnten wir tendenziell in Patienten mit einem Karzinom Procalcitonin in leicht höheren Konzentration nachweisen, dies wurde allerdings im wesentlichen durch zwei stark erhöhte Werte bei 2 Patienten bedingt. Damit ist es noch zu früh, Procalcitonin auch als einen möglichen Marker eines subklinischen Infekts bei Tumorpatienten anzusehen, möglicherweise ist seine Rolle ähnlich des C-reaktiven Proteins bei Malignomen.

4.3.3 C-reaktives Protein (CRP)

Ein weiteres tumorassoziiertes Entzündungsprotein ist das C-reaktive Protein (CRP). CRP gilt als klassischer Vertreter der Akut-Phase-Proteine. Es wurde erstmals 1930 als „Präzipitin“ für das C-Polysaccharid von Pneumokokken beschrieben. Es stellt einen der primitivsten Abwehrmechanismen des Menschen

dar. Seine biologischen Eigenschaften und Funktionen sind in ihren Einzelheiten meist noch unbekannt.

Die Synthese, die vor allem durch Interleukin-6 stimuliert wird, erfolgt in der Leber (Heinrich 1990). Man geht davon aus, dass CRP an geschädigte Zellen bindet und als Opsonin dient, welches Phagozyten aktiviert (Kushner 1982). CRP zeigt jedoch eine selektive Bindungsfähigkeit, da es nur enzymatische oder oxidativ veränderte Membranzellen bindet, nicht jedoch an die intakte Zellmembran. Aggregiertes CRP im Komplex mit einem Liganden aktiviert den klassischen Komplementweg.

Diese Eigenschaften des CRP spielen neben der Abwehr mikrobieller Infektionen insbesondere in der Reparatur von Gewebeschäden, in der Neutralisation von potentiellen Autoantigenen und vor allem in der Entstehung und Verstärkung einer Entzündungsreaktion eine Rolle. Dass dabei die Produktion von CRP neben der Leber auch lokal am Ort der Entzündung erfolgen kann, ist kürzlich in arteriosklerotischen Plaques in arterio-venösen Bypassen, in Nieren nach akuter Transplantatabstoßung, aber interessanterweise auch bei malignen Nierentumoren nachgewiesen worden (Jabs 2003).

Dass Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren oft erhöhte Plasma-CRP-Werte haben, ist bereits seit langem bekannt. Erlinger *et al.* veröffentlichten im letzten Jahr eine Studie, die zeigen konnte, dass bei Patienten mit einem Kolonkarzinom eine signifikante Erhöhung des Plasma-CRP im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv bereits vor der Diagnosestellung des Karzinoms nachzuweisen ist (Erlinger 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden im Blut von Patienten mit einem KKR signifikant höhere CRP-Werte als in den beiden anderen Gruppen gemessen. Ob es durch eine Entzündungsreaktion zu einer allgemeinen CRP-Erhöhung lediglich im Blut kommt, oder ob es durch eine lokale Entzündungsreaktion zu einer lokalen CRP-Produktion kommt ist Gegenstand unserer weiteren Forschungsarbeit. Eine lokale Synthese am Ort der Entzündung beim kolorektalen Karzinom ist bisher noch nicht untersucht worden. In Vorarbeiten für weitere Forschungsarbeiten konnten wir in 4 von 16 untersuchten neoplastischen Gewebeproben von Patienten mit

kolorektalen Karzinomen, aber in keiner der normalen Proben eine lokale CRP mRNA-Expression nachweisen.

Unsere Ergebnisse sprechen möglicherweise für eine lokale CRP-Synthese und dafür, dass sowohl Lymphozyten als auch Enterozyten zur mRNA-Synthese von CRP befähigt sein könnten. Es spricht somit viel für eine lokale Produktion dieses Proteins. Eine Schlussfolgerung kann aus der jetzigen Datenlage sicherlich noch nicht erfolgen, ein weiterer Hinweis scheint aber auf den engen Zusammenhang zwischen Karzinogenese und Entzündung gegeben zu sein.

4.3.4 Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) gehört zu der Familie der Zytokine. TNF- α wird von Immunzellen, Monozyten und Makrophagen gebildet und spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen. Er ist in der Lage NF-kappaB zu aktivieren und wirkt stimulierend auf die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber. Er hat somit eine wichtige Aufgabe in der proinflammatorischen Kaskade inne (Nakazaki 1992). Des Weiteren ist er an einer Reihe von Vorgängen beteiligt, wie beispielsweise Apoptose und Regulation des Immunsystems (Younes 2003). Auch sind für TNF- α antitumoröse Eigenschaften bekannt. Das Tumorstadium kann beispielsweise beeinflusst werden, indem Oberflächenproteine verändert werden. Erhöhte Werte im Blut sind einiger Krebspatienten beschrieben. Auch bei metastasierenden Erkrankungen konnten erhöhte TNF- α -Werte im Blut gemessen werden (Ardizzoia 1992).

In unserer Arbeit konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen feststellen. Hiernach scheint ein prädiktiver Wert von TNF- α - als auch ein Assoziation mit systemischer Entzündung für Patienten mit kolorektalem Adenom und Karzinom unwahrscheinlich.

4.3.6 Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Tumormarkern kommt bei der Verlaufbeobachtung bei malignen Erkrankungen eine besondere Bedeutung zu. So ist Carbohydrate-Antigen (CA-) 19-9-Wert im Rahmen vieler benignen und malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts sowie bei Mukoviszidose erhöht. Cancer-Antigen (CA-) -125 ist vor allem bei malignen Eierstock- und Eileitertumoren sowie bei Eileiterentzündungen erhöht. Pankreaskarzinome, Pankreatitiden, Leberzirrhose und Schwangerschaft können ebenfalls zu erhöhten Werten führen. Tissue Polypeptide Antigen (TPA) ist für das Harnblasenkarzinom der wichtigste Marker. Bronchial-, Mamma-, Magen-Karzinome, benigne Erkrankungen des GI-Trakts und der Lunge zählen neben Gravidität im dritten Trimenon zu den Ursachen für erhöhte TPA-Werte. Seto *et al.* beschrieben 2000 den Zusammenhang zwischen erhöhten TPA-Werten und dem Vorhandensein von Lebermetastasen sowie der Prognose für Patienten mit KRK (Seto 2000).

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA), ein Glykoprotein, gehört ebenfalls zu der Gruppe der Tumormarker. Erhöhte Werte findet man in erste Linie beim KRK, Mamma-, Bronchial- Magen- und gynäkologischen Karzinomen sowie malignen Erkrankungen von Pankreas und Prostata. Aber auch bei zahlreichen gutartigen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes (z.B. Leberzirrhose, Divertikulitis, Polypen, Colitis ulcerosa, Ulcus ventriculi, Pankreatitis) sowie bei Rauchern und Alkoholikern lassen sich erhöhte Werte messen (Eche 2001).

Sinkt der CEA-Wert postoperativ unterhalb des so genannten cut-off-Wertes, ist dies als Hinweis auf eine komplette Tumorentfernung zu werten. Ein Wiederanstieg spricht für ein Rezidiv. CEA ist somit vor allem als Verlaufsparemeter und bei der Tumornachsorgeuntersuchung von klinischer Bedeutung, weniger als Screeningparameter.

Wie zu erwarten konnten in der Karzinomgruppe gegenüber der Polypen- und Kontrollgruppe signifikant höhere CEA-Werte gemessen werden. Auch in der Polypengruppe konnten im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant höhere

CEA-Werte gemessen werden. Die Ergebnisse der Karzinompatienten bekräftigen den hohen Stellenwert des CEA beim KKK.

Aus den Ergebnissen kann leider kein Rückschluss auf eine eventuelle Tauglichkeit als Screeningparameter gezogen werden. Warum es in der Polypengruppe ebenfalls zu erhöhten Werten kommt, lässt sich letztlich nicht klären. Interessant wäre beispielsweise, eine Studie um ein eventuelles Entartungsrisiko bei Patienten mit erhöhten CEA-Werten näher zu erforschen. Eine Assoziation zu anderen Markern und Entzündungsproteine und eine Korrelation insbesondere zu erhöhtem Stuhlcalprotektin konnten wir nicht finden. Eine Assoziation von erhöhtem CEA zu mukosaler oder systemischer Entzündung besteht somit nach unseren Daten nicht und kann den unterschiedlichen interindividuellen prädiktiven Wert von CEA nicht erklären.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend legen unsere Untersuchungen den Schluss nahe, dass ein systemische Entzündung oder gar vermehrte Bakteriämie bei Patienten mit kolorektalem Adenom oder Karzinom nicht nachweisbar sind. Vielmehr scheint es mukosal zu einer komplexen Interaktion zwischen Bakterien, Entzündung und nachfolgender Karzinogenese zu kommen. Die beobachtete vermehrte Invasion mit enteroinvasiven Bakterien ist möglicherweise nicht kausal, zumindest ist sie nicht durch eine veränderte Expression der Defensine HBD-1 und -2, HD-5 und -6 bedingt. Auch ist kein generell gestörtes Expressionsprofil dieser Defensin weder in kolorektalen Karzinomen noch in seine Vorstufen nachweisbar. Am interessantesten waren sicherlich unserer Untersuchungen zum Calprotektin in kolorektalen Tumoren. Nach unseren Daten ist Calprotektin als Tumormarker aufgrund der starken interindividuellen Schwankung wenig viel versprechend. Allerdings scheint seine vermehrte Expression insofern tumorspezifisch zu sein, da selbst in den tumorbenachbarten Schleimhäuten auch von Patienten mit sehr hohen Werten keine geänderte Expression nachweisbar ist. Die erhöhte Expression in spezifisch den infiltrierenden Tumor aktivierten Granulozyten legt vielmehr die Vermutung nach,

das hier eine mögliche Abwehrstrategie zu beobachten ist. Eine genauere Untersuchung dieses möglichen Effekts sollte in weiteren Studien erfolgen, zumindest theoretisch scheint hier auch ein therapeutischer Ansatzpunkt zu bestehen.

5 Zusammenfassung

Bereits Virchow hat eine Assoziation zwischen Karzinogenese und entzündlichen Vorgängen beschrieben. Für zahlreiche Karzinomleiden, wie das Magen-, Leberzell- und Pankreaskarzinom, ist ein Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Vorgängen gesichert. Ein erhöhtes Krebsrisiko existiert insbesondere für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Diese Daten legen einen funktionellen Zusammenhang zwischen entzündlichem Geschehen und Krebs nahe. Bei CED-Patienten ist eine veränderte Expression sowohl von antimikrobiellen Peptiden (Defensinen) als auch eine erhöhte Stuhlexkretion von Calprotektin, einem entzündungsassoziierten Heterodimer, beschrieben. Interessanterweise ist Calprotektin auch bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom (KRK) im Stuhl erhöht nachweisbar. In einer neueren Arbeit konnte eine Kolonisierung intrazellulärer *E. coli* in Darmbiopsien von Adenom- und Karzinompatienten im Gegensatz zu Kontrollpatienten nachgewiesen werden, so dass hier erstmals eine Assoziation zwischen Bakterien, Entzündung und maligner Entartung beim KRK beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Expression von entzündungsassoziierten Markern in der Karzinogenese des KRK. Im Biopsiematerial neoplastischer und normaler Kolonschleimhaut von 28 Patienten mit einem KRK und 36 Patienten mit Adenom sowie in 30 Kontrollprobanden wurde die Expression der humanen α - und β -Defensine HBD-1 und -2 sowie HD-5 und -6 auf mRNA- und immunhistochemisch auf Proteinebene untersucht. Zusätzlich bestimmten wir in diesen Proben mittels ELISA quantitativ sowie ergänzend immunhistochemisch das Expressionsniveau und das Verteilungsmuster von Calprotektin. Diese Schleimhautexpression wurde mit der Granulozyteninfiltration korreliert. Ergänzend wurde im Serum der Probanden Calprotektin, TNF- α , Procalcitonin, CRP, CEA sowie zum Ausschluss einer Bakteriämie der *Limulus-Amöbozyten-Lysat-(LAL)*-Test durchgeführt.

Für die untersuchten humanen Defensine konnten wir weder in der Immunhistochemie auf Protein- noch in der PCR auf mRNA-Ebene signifikante

Unterschiede in den einzelnen Gruppen feststellen. Bei Patienten mit einem KRK konnten wir im Tumor signifikant höhere Calprotektinwerte im Vergleich zur Tumorbenachbarten Schleimhaut ($p = 0,002$) oder den Kontrollen ($p < 0,0001$) messen. In der Adenomgruppe lag der Wert in der tumorösen Schleimhaut ebenfalls höher als in der benachbarten Schleimhaut ($p = 0,025$). Immunhistochemisch war Calprotektin vor allem in Entzündungszellen an der Invasionsfront des Tumors stark exprimiert, es bestand eine hohe Korrelation zur Granulozyteninfiltration ($r = 0,89$, $p = 0,0001$), während in Tumorbenachbarten Schleimhäuten nur sehr vereinzelt Zellen positiv waren. Systemisch konnten wir für C-reaktives Protein (CRP) und CEA in der Karzinomgruppe im Blut höhere Werte messen, für TNF- α , Calprotektin und Procalcitonin konnten keine Unterschiede festgestellt werden, auch war eine relevante Bakteriämie mittels *LAL*-Test nicht nachweisbar.

Nach unseren Daten ist die beschriebene vermehrte intraepitheliale Invasion mit enteroinvasiven Bakterien bei Patienten mit KRK nicht Folge einer gestörten Expression der untersuchten Defensine, so dass hier ein funktioneller Zusammenhang zwischen gestörter unspezifischer Abwehr und Kolorektalkarzinogenese nicht belegt werden konnte. Auch ist in unserem Kollektiv keine relevante systemische Entzündungsantwort oder Bakteriämie nachweisbar. Bei deutlich erhöhten CRP-Werten bei nur einigen Patienten mit einem KRK ohne relevante systemische Entzündungsantwort stellt sich in Kenntnis neuerer Daten die Frage, ob dies nicht auch Folge einer lokalen Produktion im malignen Gewebe sein könnte. Die Calprotektin Exkretion im Stuhl von Patienten mit KRK ist nach unseren Daten Folge einer erhöhten Expression in aktivierten, infiltrierenden Entzündungszellen in der malignen Schleimhaut und eher nicht Konsequenz einer vermehrten Exkretion im Sinne eines „leaky gut“. Die spezifische Expression in Entzündungszellen an der Invasionsfront des Tumors sowie neuere Daten zu Calprotektin als zytotoxischem und Apoptose-induzierendem Protein lassen sogar die Vermutung zu, dass es sich bei der vermehrten Expression im malignem Gewebe um einen Mechanismus der unspezifische Tumorabwehr handeln könnte.

Abkürzungen

A

A	Adenosin / Ampere
AA	Acrylamid
AB Serum	hitzeinaktiviertes Humanserum
Ac	Acetat
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
APC-Gen	adenomatösen Polyposis-coli Gen
ATP	Adenintriphosphat

B

Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovin serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)

C

C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CA	Karzinom / Cancer-Antigen / Carbohydrate-Antigen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
cRNA	<i>complementary</i> RNA
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CoA	CoEnzym A
COX	Cyclooxygenase
CRP	C- reaktives Protein

D

d	Desoxy-
DDC	detection colorectal cancer

DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E	
E.coli	Escherichia coli
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EU	Endotoxin Unit (1ng = 10 EU)
F	
FAB	familiäre adenomatöse Polyposis
FOBT	Test auf fäkales okkultes Blut
G	
g	Gramm / Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GI	gastrointestinal
H	
h	Stunde
HBD	humanes beta Defensin
HD	humanes Defensin
HNPCC	hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom
K	
KRK	kolorektales Karzinom

L

l	Liter
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat

M

M	Molar
M.	Morbus
mA	Milliamper
min	Minute
ml	Milliliter
MLH	
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MSH	

N

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotide

P

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	Picogramm
pH	pontus hydrogenii

R

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaktion</i>
S	
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD	Standardabweichung des Mittelwerts
SEM	Standardabweichung des mittleren Fehlers
SH	Schleimhaut
T	
t	Zeit
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TF	Tissue factor
TNF- α	Tumornekrose Faktor alpha
TNM	
TPA	Tissue Polypeptide Antigen
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TU	Tumor
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	
U	Uridin
UICC	Union International Contre Cancer
UV	Ultraviolett
μg	Microgramm
V/ W	
V	Volt
W	Watt

7 Literaturverzeichnis

- **Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C.** High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*. 1993; 341 (8844): 515- 8
- **Alberts DS, Martinez ME, Roe DJ, Guillen-Rodriguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB, Reid ME, Ritenbaugh C, Vargas PA, Bhattacharyya AB, Earnest DL, Sampliner RE.** Lack of effect of high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N Engl J Med* 2000 ; 342: 1156- 62.
- **Ardizzoia A; Lissoni P; Brivio F; Tisi E; Perego M S; Grassi M G; Pittalis S; Crispino S; Barni S; Tancini G.** Tumor necrosis factor in solid tumors: increased blood levels in the metastatic disease. *J Biol Regul. and Homeost. Agents* 1992; 6 (3) 103-7
- **Balkwill F und Mantovani A.** Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 359- 545
- **Blayney DW, Jaffe ES, Blattner WA, Cossman J, Robert-Guroff M, Longo DL, Bunn PA Jr, Gallo RC.** The human T-cell leukemia/lymphoma virus associated with American adult T-cell leukemia/lymphoma *Blood*. 1983; 62 (2): 401-405
- **Bansal P und Sonnenberg A.** Risk factors of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 44– 48 (III)
- **Bevins CL, Martin- Porter E, Ganz T.** Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*. 1999, 45 (6): 911-5
- **Broome U, Lofberg R, Veress B und Eriksson LS.** Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: evidence for increased neoplastic potential. *Hepatology* 1995; 22: 1404– 1408 (II a)

- **Carreras F, Sarli L, Pietra N, Longinotti E, Gafa M, Peracchia A.** A critical review of the history of the systems for staging colorectal cancer. *G Chir.* 1992; 13 (5): 287- 92
- **Courtney ED, Melville DM und Leicester RJ.** Review article: chemoprevention of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Jan 1; 19 (1): 1- 24
- **Coussens LM, Werb Z.** Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 19- 26; 420 (6917): 860- 7. Review
- **Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I.** Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all over expressed in common cancers. *Histopathology.* 2005 46 (3): 256- 269
- **Diamond G, Russell JP, Bevins CL.** Inducible expression of an antibiotic peptid gene in lipopolysaccharide- challenged tracheal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 1996; 5156- 5160
- **Dvorak HF.** Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumour stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650- 1659
- **Eaden JA, Abrams KR und Mayberry JF.** The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526– 535 (II a)
- **Eche N, Pichon M-F, Quillien V, Gory-Delabaere G, Riedinger J-M, Basuyau J-P, Daver A, Buecher B, Conroy T, Dieu L, Bidart J-M, Deneux L.** Standards, Options et Recommandations : marqueurs tumoraux sériques dans les cancers du côlon. *Bulletin du Cancer.* 2001; 12: 1177-206
- **Ekbom A, Helmick C, Zack M und Adami HO.** Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323: 1228– 1233 (II b)
- **Erlinger TP, Platz EA, Rifai N und Helzlsouer KJ.** C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA* 2004; 291 (5): 585- 590

- **Fagerhol M K, Dale I, Baoye N, Field N und Urianstad M.** Plasma L1 protein levels: a marker for early pulmonary cancer. *Clin Res.* 1985; 33: 617A
- **Fagerhol MK, Dale I, Andersson T.** A radioimmunoassay for a granulocyte protein as a marker in studies on the turnover of such cells. *Bull.Eur. Physiopathol. Respir.* 1980; 16: 273-82
- **Fearon ER und Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1; 61 (5): 759- 67
- **Fellermann K und Stange EF.** Defensins – innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 771- 776, 2001.
- **Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR und Stange EF.** Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Jun; 15 (6): 627- 34.
- **Frye M, Bargon J, Lembke B, Wagner TOF und Gropp R.** Differential expression of human α - and β -defensins mRNA in gastrointestinal epithelia. *Eur J Clin Invest* 30: 695- 701, 2000.
- **Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE und Willett WC.** Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 1999; 340: 169- 76
- **Ganz T.** Defensins and Host Defence. *Science* 286: 420- 421, 1999
- **Garcia JR., Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R und Forssmann WG.** Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* 2001; 15: 1819- 21
- **Gebhardt C, Breitenbach U, Tuckermann JP, Dittrich BT, Richter KH, Angel P.** Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. *Oncogene* 2002. 21 (27): 4266-76

- **Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, Karami-Tehrani F.** Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J Leukoc Biol.* 2004, 76 (1): 169-75
- **Gilat T, Fireman Z, Grossman A, Hacoheh D, Kadish U, Ron E, Rozen P und Lilos P.** Colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. A population study in central Israel. *Gastroenterology* 1988; 94: 870– 877 (II a)
- **Gyde SN, Prior P, Allan RN, Stevens A, Jewell DP, Truelove SC, Lofberg R, Brostrom O und Hellers G.** Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres. *Gut* 1988; 29: 206– 217 (II a)
- **Hahn BL, Sohnle PG.** Resistance of zinc-supplemented *Candida albicans* cells of calprotectin. *J Infect Dis* 1995; 171: 1289-94
- **Harder J, Bartels J, Christophers E und Schröder JM.** Isolation and characterisation of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276: 5707- 5713, 2001
- **Hecht G.** Innate mechanisms of epithelial host defence: spotlight on intestine. *Am J Physiol.* 1999 Sep; 277 (3 Pt 1):C351- 8
- **Heinrich PC, Castell JV und Andus T.** Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265: 621- 36
- **Heuschen UA, Heuschen G und Stern J.** Backwash ileitis in ulcerative colitis – new aspects in the assessment of the disease 1997, 245– 249. in: Andus T, Goebell H, Layer P und Schömerich J. Inflammatory bowel diseases- from bench to bedside. Dordrecht/ Boston/ London, *Kluwer Academic Publishers*, 1997: 245- 249 (III)
- **Hoff G, Grotmol T, Thiis-Evensen E, Bretthauer M, Gondal G und Vatn MH.** Testing for faecal calprotectin in the Norwegian colorectal cancer prevention trial on flexible sigmoidoscopy screening: comparison with an immunochemical test for occult blood. *GUT* 2004; 53: 1329- 1333

- **Jabs WJ, Logering BA, Gerke P, Kreft B, Wolber EM, Klinger MH, Fricke L und Steinhoff J .** The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur J Immunol* 2003; 33 (1): 152- 161
- **Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ;** Cancer statistics, 2004. *Cancer J Clin.* 2004; 54 (1): 8-29
- **John B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brantzaeg P, Naess-Andresen CF und Dale I.** Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *J Clin Pathol* 1997; 50: 113- 123
- **Kong JP, Ding F, Zhou CN, Wang XQ, Miao XP, Wu M, Liu ZH.** Loss of myeloid-related proteins 8 and myeloid-related proteins 14 expression in human esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor differentiation. *World J Gastroenterol.* 2004;10 (8): 1093- 1097
- **Kristinsson J, Roseth A, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H, Bormer OP, Raknerud N und Nygaard K.** Calprotectin Fecal concentration in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 316- 321
- **Kullmann F, Bocker T, Scholmerich J und Ruschoff J.** Microsatellite instability—a new aspects in genetics and molecular biology of hereditary nonpolyposis and sporadic colorectal tumors; *Z Gastroenterol* 1996; 34: 813- 22
- **Kuper A, Adami HO, Trichopoulos D.** Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern. Med.* 2000; 248: 171- 183
- **Kushner I.** The phenomen of acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 389: 39- 48
- **Lamberti C, Di Blasi K, Archut D et al.** Population based registration of unselected colorectal cancer patients: five year survival in the region of Bonn/ Rhein- Sieg, Germany; *Z Gastroenterol* (im Druck)

- **Leder LD.** Über die selektive fermentcytochemische Darstellung von neutrophilen myeloischen Zellen und Gewebsmastzellen im Paraffinschnitt. *Klin Wochenschrift* 1964; **42**: 553-60
- **Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selstedt ME.** Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bacterial activity. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 553-561
- **Lehrer RI, Ganz T, Selstedt MD.** Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of animal cells. *Cell* 1991; 64: 229-30
- **Lehrer RI, und Ganz T.** Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 23-27
- **Limburg PJ, Devens ME, Harrington JJ, Diehl NN, Mahoney DW, Ahlquist DA.** Prospective evaluation of faecal calprotectin as a screening biomarker for colorectal neoplasia. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98 (10): 2299-305
- **Logan RPH.** *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* 1994; 344: 1078-1079
- **Martin-Porter E, van Dam E, Valore EV und Ganz T.** Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Human Intestinal Defensin 5. *Infect Immun* 1997; 65: 2396-2401
- **Morris JDH, Eddleston ALWF, Crook T.** Viral infections and cancer. *Lancet* 1995; 346: 754-758
- **Morson BC.** President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med.* 1974; 67 (6): 451-7
- **Nakazaki H.** Preoperative and postoperative cytokines in patients with cancer. *Cancer* 1992; 70: 709-713
- **Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE, Surawicz TS und Marcus PM.** Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84 (20): 1572-5

- **O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, Dickersin GR, Ewing S, Geller S, Kasimian D, et al.** The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 1990; 98 (2): 371- 9
- **Ott HW, Lindner H, Sarg B, Mueller-Holzner E, Abendstein B, Bergant A, Fessler S, Schwaerzler P, Zeimet A, Marth C, Illmensee K.** Calgranulins in cystic fluid and serum from patients with ovarian carcinomas. *Cancer Res*. 2003; 63 (21): 7507- 14
- **Pasetto LM, Rossi E und Monfardini S.** Liver metastases of colorectal cancer: medical treatments. *Anticancer Res*. 2003; 23 (5b): 4245-56
- **Poullis A, Foster R, Mendall MA und Fagerhol MK.** Emerging role of calprotectin in gastroenterology. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003; 18 (7): 756-62
- **Rau B, Steinbach G, Gansauge F, Mayer JM, Grünert A, Beger HG.** The role of Procalcitonin and Interleukin-8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut*. 1997; 41: 832- 840
- **Ruf et al.** Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge des kolorektalen Karzinoms. Tumorzentrum Freiburg Stand 2000
- **Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumlbers S, Schonfield G, Kamm M, Williams C, Price A, Talbot I und Forbes A.** Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 451– 459 (II b)
- **Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, Tack BF und Vogel HJ.** The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 2002; 277: 8279- 8289
- **Schmiegel W.** Das Kolorektale Karzinom -anlässlich des Sozialmedizinischen Expertenforums des MDS „Je früher desto besser? Screening – Früherkennung - Vorsorge“ am 5. Dezember 2002 in Berlin

- **Schröder JM, Harder J.** Molecules in focus: Human beta-defensin-2. *Int J biochem Cell Biol.* 1999; 31 (6): 645-51
- **Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arie S, Imamura M.** Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer.* 2000;88 (2): 295- 301
- **Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D.** Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res.* 2004; 64 (24): 9018- 26
- **Slattery ML, Schumacher MC, Smith KR, West DW, Abd- Elghany N.** Physical activity, diet and risk of colon cancer in Utah. *Am J Epidemiol* 1988; 128: 989- 99
- **Soetikno RM, Lin OS, Heidenreich PA Young HS und Blackstone MO.** Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 48– 54 (II a)
- **Steward BW und Kleinhues P.** World cancer report. *IARC Press Lyon* 2003
- **Sugita A, Sachar DB, Bodian C, Ribeiro MB, Aufses AH Jr und Greenstein AJ.** Colorectal cancer in ulcerative colitis. Influence of anatomical extent and age at onset on colitis-cancer interval. *Gut* 1991; 32: 167– 169 (III)
- **Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J und Lochs H.** Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer; *Gastroenterology* 1998; 115 (2): 281- 286
- **Tarver AP, Clark DP, Diamond G, Russell JP, Erdjument- Bromage H, Tempest P, Cohen KS, Jones DE, Sweeney RW, Wines M, Hwang S, Bevins CL.** Enteric beta defensins: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvium* infection. *Infect. Immun.* 66 1998; 1045- 1056

- **Tibble J, Sigthorsson G, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M und Bjarnason I.** Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal cancer and adenoma. *Gut* 2001; 49: 402- 408
- **Towler B, Irwig L, Glasziou P, Kewenter J, Weller D und Silagy C.** A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *BMJ.* 1998; 317 (7158): 559- 65
- **Tugizov S, Berline J, Herrera R, Penaranda ME, Nakagawa M, Palefsky J.** Inhibition of human papillomavirus type 16 E7 phosphorylation by the S100 MRP-8/14 protein complex. *J Virol.* 2005. 79 (2): 1099-1112
- **Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM und Bos JL.** Genetic alterations during colorectal tumour development. *N Engl J Med.* 1988; 319 (9): 525- 32
- **Vogt W.** Colorectal carcinoma: screening-early detection. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 2002; 91 (43): 1791- 6
- **Wang J, Cai Y, Zhao J, XU X, Han YL, XU ZX, Chen BS, Hu H, Wu M, Wang MR.** Expression of MRP14 gene is frequently down-regulated in Chinese human esophageal cancer. *Cell Res.* 2004; 14 (1): 46- 53
- **Welton JC, Marr JS, Friedman SM.** Association between hepatobiliary cancer and thyphoid carrier state. *Lancet* 1979; 8120: 791- 793
- **Winawer SJ, Flehinger BJ, Schottenfeld D und Miller DG.** Screening for colorectal cancer with faecal occult blood testing and sigmoidoscopy. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85 (16): 1311- 8
- **Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, Woolf SH, Glick SN, Ganiats TG, Bond JH, Rosen L, Zapka JG, Olsen SJ, Giardiello FM, Sisk JE, Van Antwerp R, Brown-Davis C, Marciniak DA und Mayer RJ.** Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112 (2): 594- 642

- **Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al.** Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med.* 1993; 329 (27): 1977- 81
- **Yoshimoto T, Yamaai T, Mizukawa N, Sawaki K, Nakano M, Yamachika E, Sugahara T.** Different expression patterns of beta-defensins in human squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2003; 23 (6C): 4629-33
- **Younes A und Aggarwall BB.** Clinical implications of the tumour necrosis factor family in benign and malignant haematologic disorders. *Cancer.* 2003; 98 (3): 458- 67
- **Yui S, Nakatani Y und Mikami M.** Calprotectin (S100A8/S100A9), an Inflammatory Protein Complex from Neutrophils with a Broad Apoptosis-Inducing Activity. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26 (6): 753- 60
- **Zhao, C, I. Wang, and R.I. Lehrer.** Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 1996; 396:319-22

8 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand in der Medizinischen Klinik I, Bereich Gastroenterologie, des Universitäts-Klinikums Schleswig Holstein Campus Lübeck. Ich danke allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanke ich mich bei:

Herrn PD Dr. med. Nils Homann für die Überlassung des Themas und für seine außergewöhnliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie seine Geduld, vor allem in den letzten Stunden.

Herrn Prof. Dr. med. Diether Ludwig und Herrn Prof. Dr. med. Horst Lorenz Fehm für die Bereitstellung des finanziellen Rahmens dieser Arbeit und die Möglichkeit, in Ihrer Klinik die Doktorarbeit zu verfassen.

Herrn Dr. med. Jan Wehkamp vom Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung zunächst bei der Immunhistochemie und später bei Fragen zu Neuerkenntnissen der Defensinforschung.

Herrn Dr. med. Klaus Feller mann vom Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart für seine Einsatzbereitschaft und große Hilfe bei der Mitkonzeption der Arbeit und allen sich ergebenden Schwierigkeiten.

Herrn Dr. med. Frank Noack, Institut für Pathologie, UKSH Campus Lübeck, für seine Hilfe beim Aussuchen der Schnittpräparate und der Kontrolle meiner immunhistochemischen Daten.

Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Duchrow aus der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck für seine Unterschützung und Bereitstellung von Geräten.

Dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. W. Solbach) für die Bestimmung des Procalcitonins und die Einarbeitung in den Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test.

Dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner) für die Bestimmung des Carcinoembryonalen Antigens.

Dem Institut für klinischen Chemie der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. M. Seyfarth) für die Bestimmung des Albumins und C-reaktiven Proteins.

Frau Stefanie Wichmann für die Einführung in die Laborarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Frau Heidi Schlichting und Frau Angela Oldörp für ihre Hilfs- und Organisationsbereitschaft.

Meinem Mitdoktoranden Michael Steppat für die freundschaftliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit

und nicht zuletzt meiner Familie und Freunden (vor allem Tobias Linden für das Korrekturlesen) für ihre Geduld und die Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kim Barbara Luley
Adresse: Attendornstr. 57
23564 Lübeck
Deutschland
Tel.: 0451-9308929

Geburtsdatum: 07.03.1976 in Lübeck
Familienstand: ledig
Konfession: römisch- katholisch
Staatsangehörigkeit: deutsch

Familie

Vater: Rudolf Luley, geb.: 04.08.1939,
Diplomkaufmann
Mutter: Brigitte Luley, geb. Hons, geb.: 02.06.1947,
Diplomkauffrau
Schwester: Wibke Luley, geb.: 06.06.1974,
Juristin

Schulbildung

1982 - 1986 Klosterhof-Grundschule Lübeck
1986 – 1991 Burgau Gymnasium Düren, bilingualer Zweig (deutsch-
französisch)
1991 - 1995 Gymnasium am Hoptbühl Villingen
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

WS 1996/1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Medizinischen
Universität zu Lübeck
Physikum bestanden im März 1999
1.Staatsexamen bestanden im März 2000
2.Staatsexamen bestanden im September 2002
3.Staatsexamen bestanden im Dezember 2003
Abschluss des Studiums am 09.12.2003
Gesamtnote: gut

seit SS 2000 Doktorandentätigkeit in der Medizinischen Klinik I
Universitätsklinikum zu Lübeck, Bereich
Gastroenterologie, bei PD Dr. N. Homann

Beruflicher Werdegang

seit Mai 2004 Assistenzärztin in der Medizinischen
Klinik I, UKSH-Campus Lübeck, z.Z. Station 41b

Fremdsprachen

Französisch und Englisch (fließend), Hebräisch
(Grundkenntnisse), Latinum

Posterpräsentationen

K. Luley, N. Homann, K. Fellermann, J. Wehkamp, EF. Stange, D. Ludwig.
Expression epithelialer Defensine bei kolorektalen Neoplasien - Indikator einer
gestörten Schleimhautbarriere Z Gastroenterol 2002; 8, 709 P232

K. Luley, N. Homann, K. Fellermann, J. Wehkamp, E.F. Stange, D. Ludwig: The
local expression of calprotectin, defensins and markers of bacteremia in patients

with colorectal neoplasms. GUT (2003) Suppl VI, 52: Mon-G-077, A75

K. Luley, K. Fellermann, J. Wehkamp, D. Ludwig, N. Homann: Increased local calprotectin (S100A8/S100A9) production in patients with colorectal cancer and polyps: Implication of an innate defence system against carcinogenesis? (submitted)

K. Luley, D. Ludwig, N. Homann: Increased faecal calprotectin levels in colorectal cancer are caused by the mucosal production in the neoplastic tissue. Gastroenterology (2004) 126 Suppl II (M1496)

K. Luley, W. Jabs, D. Ludwig, N. Homann: local calprotectin and CRP production in colorectal carcinogenesis. Posterpräsentation: Digestive Disease Week, Chicago, USA 2005.

Kim Barbara Luley

Lübeck, den 20.05.2005