

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
DIREKTOR: PROF. DR. MED. J. SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**NACHWEIS DER EPITHELIAL-MESENCHYMALEN TRANSFORMATION BEI DER
ENTSTEHUNG VON FISTELN BEI PATIENTEN MIT MORBUS CROHN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christian Rohrmeier

2008

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
DIREKTOR: PROF. DR. MED. J. SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**NACHWEIS DER EPITHELIAL-MESENCHYMALEN TRANSFORMATION BEI DER
ENTSTEHUNG VON FISTELN BEI PATIENTEN MIT MORBUS CROHN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christian Rohrmeier

2008

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler

2. Berichterstatter:

PD Dr. med. Frauke Bataille

Tag der mündlichen Prüfung:

18.05.2009

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	1
1 EINLEITUNG	1
1.1 Aufbau der Darmwand.....	1
1.2 Morbus Crohn	2
1.2.1 Ätiologie und Pathogenese.....	3
1.2.2 Symptomatik und Therapie.....	5
1.3 Fisteln als klinisches Problem beim Morbus Crohn.....	6
1.3.1 Allgemeines zu Fisteln beim Morbus Crohn	6
1.3.2 Therapiemöglichkeiten und Heilungschancen der Fisteln.....	7
1.3.3 Pathogenese der Fistelentstehung beim Morbus Crohn.....	7
1.3.4 Histologische Charakterisierung von Fisteln beim Morbus Crohn.....	8
1.4 Epithelial-Mesenchymale Transformation (EMT)	9
1.4.1 Bedeutung und Vorkommen der EMT	9
1.4.2 Charakterisierung und Ablauf der EMT.....	10
1.4.3 EMT bei Karzinomen und Fibrose	13
1.5 Hypothese, Arbeitsziele	16
2 MATERIALIEN UND GERÄTE	18
2.1 Chemikalien und Reagenziensätze (Kits)	18
2.1.1 Immunhistochemie.....	18
2.1.2 Zellkultur	18
2.1.3 Western Blotting	19
2.1.4 Immunozytochemie.....	20
2.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien	21
2.3 Laborausstattung, Geräte	22

2.4	Nährmedien, Puffer, Gele und Lösungen	23
2.4.1	Nährmedien	23
2.4.2	Allgemeine Puffer	23
2.4.3	Protein-Isolierung.....	24
2.4.4	Western-Blotting	24
3	METHODEN	26
3.1	Immunhistochemie	26
3.1.1	Paraffinschnitte	27
3.1.2	Demaskierung.....	28
3.1.3	Färbeablauf nach View-Protokoll	29
3.1.4	Auswertung, statistische Analyse	30
3.2	Zellkultur.....	30
3.2.1	Isolation und Kultur von primären humanen intestinalen Fibroblasten....	30
3.2.2	Einfrieren von Zellen.....	32
3.2.3	Auftauen von Zellen.....	32
3.2.4	Kultur von intestinalen Fibroblasten.....	32
3.3	Western Blotting	33
3.3.1	Zytosolpräparation	34
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
3.3.3	Vorbereitung der Proben	34
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.3.5	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)	35
3.3.6	Immundetektion der Proteine.....	36
3.3.7	Stripping der Nitrozellulosemembran.....	37
3.4	Immunozytochemische Färbung.....	38
3.4.1	Aussaat der Zellen auf 2-well-chamber-slides	38
3.4.2	Fixierung der Zellen	38
3.4.3	Färbeverfahren mit dem Universal-DAKO-APAAP-Kit.....	38

4	ERGEBNISSE	40
4.1	Immunhistochemische Untersuchungen von Fisteln bei Morbus Crohn-Patienten.....	40
4.1.1	Die Zellen der Übergangszone enthalten die epithelialen Intermediärfilamente Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20	40
4.1.2	In den Zellen der Übergangszone ist keine Expression des mesenchymalen Intermediärfilaments Vimentin detektierbar	44
4.1.3	Im Übergangsbereich nimmt die Expression von E-Cadherin und β -Catenin ab und ist meist nur noch fragmentiert vorhanden	46
4.1.4	Im Übergangsbereich ist eine sehr starke Integrin β 6-Expression zu finden.....	50
4.1.5	Im Übergangsbereich zeigt sich eine signifikante TGF- β 1-Expression und eine Zunahme der TGF- β 2-Expression	52
4.1.6	Immunhistochemien an Analfisteln zeigen tendenziell die gleichen Ergebnisse wie bei den Darmfisteln.....	56
4.2	Myofibroblasten-Analysen durch Western Blots	58
4.2.1	Die Myofibroblasten-ähnlichen Zellen aus den Fisteln von Morbus Crohn-Patienten enthalten Vimentin und α -Smooth-muscle-Actin.....	58
4.2.2	Kein E-Cadherin-Nachweis in den Myofibroblastenlysaten	59
4.2.3	Schwache Banden beim TGF- β 1-Nachweis im Lysat von Myofibroblasten-ähnlichen Zellen aus Morbus Crohn-Fisteln	60
4.2.4	Menge an TGF- β 2 in den Myofibroblastenlysaten liegt unter der Nachweisgrenze	61
4.2.5	Zytokeratin 8 in Myofibroblasten aus Morbus Crohn-Fisteln nachweisbar	62
4.2.6	Zytokeratin 8-Nachweis in Myofibroblasten-ähnlichen Zellen auch durch Immunozytochemie.....	63
5	DISKUSSION.....	64
5.1	Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20	65
5.2	Vimentin	66
5.3	E-Cadherin	67

5.4	β -Catenin.....	69
5.5	Integrin $\beta 6$	70
5.6	TGF- $\beta 1$ und TGF- $\beta 2$	71
5.7	Untersuchung der vermutlich durch EMT entstandenen Zellen.....	73
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick	75
5.9	Ergebnisse der Arbeit in schematischer Übersicht.....	76
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	79
8	ANHANG	92
8.1	Lebenslauf.....	92
8.2	Danksagung	93

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin Complex
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninic acid
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
BSA	Bovine serum albumine (Rinder-Serum-Albumin)
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transformation
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
HANK'S, HBSS	Balanced salt solution nach Hank
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IGF II	Insulin-like growth factor II
LRR	Leucine-rich repeat
LSAB [®]	Labelled StreptAvidin-Biotin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natronlauge
P/S	Penicillin / Streptomycin

PBS	Phosphate buffered salt solution (phosphatgepufferte Salzlösung)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
subsp.	Subspecies
TBS	Tris-Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming-Growth-Factor β
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
α -SMA	α -Smooth-muscle-Actin

1 EINLEITUNG

Fisteln sind ein häufig auftretendes und klinisch schwerwiegendes Problem bei Patienten mit Morbus Crohn. Sie bedeuten für die Betroffenen eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität. Doch trotz der Häufigkeit ihres Auftretens mangelt es noch an effektiven Therapiemöglichkeiten. Daher ist die wissenschaftliche Untersuchung der Pathophysiologie der Fistelentstehung dringend angezeigt.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und inwieweit die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) eine Rolle bei der Entstehung von Fisteln bei Patienten mit Morbus Crohn spielt.

1.1 Aufbau der Darmwand

Um die folgenden Abschnitte besser verstehen zu können, wird hier kurz auf den Aufbau der Darmwand eingegangen.

Die Darmwand lässt sich in vier Schichten unterteilen, nämlich die Mukosa, die Submukosa, die Muskularis propria und die Serosa (Abb. 1-1).

Die Mukosa, die die oberste Schicht darstellt, gliedert sich wiederum in drei Subschichten: Eine einschichtige, auf einer Basalmembran fixierte Epithelschicht begrenzt das Darmlumen; darunter liegt die Lamina propria, die aus lockerem retikulären Bindegewebe, zahlreichen Kapillaren, Lymphgefäßen, Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Plasmazellen und Eosinophilen besteht. Die unterste Subschicht bildet die Muscularis mucosae, die etwa fünf Zellen dick ist und der Mukosa durch ihre glatten Muskelzellen Konturveränderungen erlaubt.

Die Submukosa ist ein loses Maschenwerk aus dünnen Kollagenfibrillen, das die Mukosa mit der Muskularis propria verbindet. Sie ist reich an Blutgefäßen und Lymphbahnen.

Die Muskularis propria besteht aus einer inneren Ring- und einer äußeren Längsmuskulatur mit jeweils dicht gepackten glatten Muskelzellen, die von dünnen Kollagenfibrillen umgeben sind. Diese Fibrillen verbinden sich zu Kollagenfasern und bilden intramuskuläre Septen aus.

Von der Bauchhöhle wird die Darmwand durch die Serosa abgegrenzt, die aus flachem bis kubischem Epithel (Mesothel) besteht.

Kollagen ist das im Darm vorherrschende Bindegewebsprotein, welches von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und glatten Muskelzellen produziert wird.

Laut Analysen überwiegen im intestinalen Muskel die Kollagentypen I und III. [1]

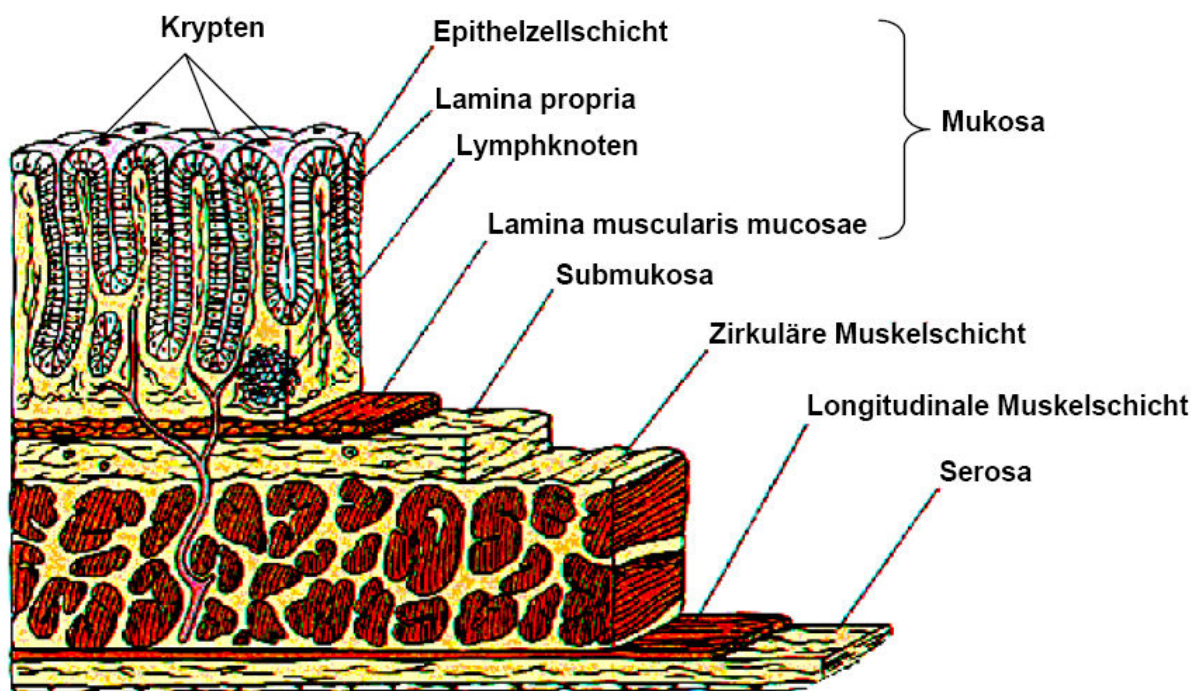


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau der Darmwand (in Anlehnung an: [2])

1.2 Morbus Crohn

Der Morbus Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung. Seine Ätiologie und Pathogenese sind bislang noch nicht eindeutig geklärt. Die Inzidenz von Morbus Crohn liegt in den westlichen Industriestaaten bei etwa 2 bis 6 pro 100.000, die Prävalenz bei 30 bis 50 pro 100.000. [3] Männer und Frauen erkranken ungefähr gleich häufig, das Alter bei der Erstmanifestation liegt meist zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr.

1.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Im Verständnis der Pathogenese des Morbus Crohn konnten in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden. Aktuell wird die Erkrankungsursache im Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren gesehen. [4]

Die Bedeutung der Genetik wird vor allem an Zwillingsstudien und dem gehäuften familiären Vorkommen von Morbus Crohn deutlich. So liegt die Prävalenz bei Verwandten ersten Grades 10,3-mal höher als in der Durchschnittsbevölkerung [5], 2 - 14% der Betroffenen berichten über eine positive Familienanamnese. Zwillingsstudien ergaben bei monozygoten Zwillingen eine Konkordanz von 42% bis 58%, bei dizygoten jedoch keinen signifikanten Unterschied zu normalen Geschwistern. [4-6]

Durch genetische Kopplungsanalysen ist es in den letzten Jahren gelungen, Risikoregionen auf den Chromosomen 1, 3, 5, 6, 7, 12, 14, 16 und 19 zu identifizieren. [4] Eine besonders wichtige Rolle könnte nach neueren Untersuchungen das CARD15-Gen (früher NOD2, Abb. 1-2) spielen, in dem bei Morbus Crohn-Patienten drei Mutationen gefunden wurden, die in signifikantem Zusammenhang mit der Erkrankung stehen. [7] In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bis zu 50% der Erkrankten einen Defekt im CARD15-Gen besitzen. [8] Heterozygote Träger einer solchen Veränderung haben dabei ein 2 - 6fach, homozygote ein 20 - 40fach erhöhtes Risiko für Morbus Crohn. [4,9,10] Außerdem konnte beobachtet werden, dass ein solcher Gendefekt vermehrt zu einem Befall des Ileum, zu Stenosen und insgesamt einem mehr penetrierenden Krankheitstyp führt. [8,10-12]

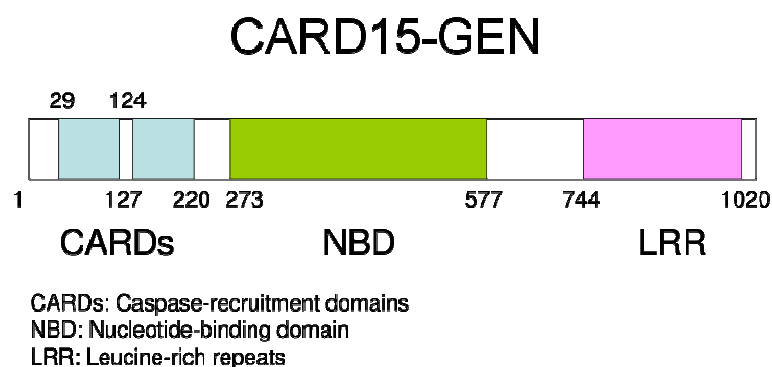


Abb. 1-2: Genetische Struktur des auf Chromosom 16 liegenden CARD15-Gens. Für die Erkennung der bakteriellen Lipopolysaccharide ist die LRR-Domäne verantwortlich. 93% der Mutationen liegen im distalen Drittel des Gens (in Anlehnung an: [4])

Es wird angenommen, dass das auf Chromosom 16 liegende CARD15-Gen für ein intrazelluläres Rezeptorprotein codiert, welches mit infektiösen bakteriellen Lipopolysacchariden interagieren kann und vor allem in Monozyten, Makrophagen und im Ileum in Paneth-Zellen exprimiert wird. Dort kann es Apoptose induzieren und Signalwege des Transkriptionsfaktors NF- κ B aktivieren, welcher insbesondere bei Entzündungsvorgängen eine wichtige Rolle spielt. [8,13,14]

Bei Mutationen zeigte sich eine verminderte Aktivierung von NF- κ B als Antwort auf bakterielle Antigene. Dies könnte darauf hindeuten, dass primär nicht eine Überreagibilität sondern eher eine zu geringe Antwort des Immunsystems das eigentliche Problem ist. [15]

Brant et al. konnten jedoch aufzeigen, dass CARD15-Mutationen nicht in signifikanter Weise mit einer positiven Familienanamnese in Beziehung stehen, was darauf hinweist, dass noch andere genetische Risikofaktoren und familiäre Umweltfaktoren eine Rolle spielen müssen. [16]

Die Beteiligung von Bakterien bei der Entstehung von Morbus Crohn und eine fehlerhafte Kommunikation mit dem Immunsystem gelten mittlerweile als gesichert. [17,18] Diskutiert wird unter anderem das kürzlich in einigen Studien in Gewebeproben nachgewiesene Mykobakterium avium subsp. paratuberculosis. [19,20] Da es der Verursacher der bei Tieren vorkommenden Paratuberkulose ist, die große Ähnlichkeit mit Morbus Crohn besitzt, wurde es schon früher verdächtigt. Es gibt jedoch ebenfalls Untersuchungen, die sehr klar gegen eine pathologisch relevante Rolle dieses Bakteriums sprechen. [21]

Der Konsum von Tabak steht in signifikantem Zusammenhang mit Morbus Crohn. So liegt die Prävalenz von aktiven Rauchern, die an der chronisch entzündlichen Erkrankung leiden, deutlich über der in der Durchschnittsbevölkerung. Besonders deutlich ist dies bei Patienten mit einem Erkrankungsalter von 40 Jahren oder älter zu sehen. [4,16,22,23]

Weitere Faktoren, die mit der Entstehung von Morbus Crohn in Zusammenhang gebracht wurden, ohne dass sie bestätigt werden konnten, sind orale Kontrazeption, Maserninfektionen, Ernährung [18], Mikropartikel [24] und eine evtl. Schutzfunktion durch das Stillen mit Muttermilch [23]. Psychische Risikofaktoren als Ursache konnten nicht nachgewiesen werden. [25]

1.2.2 Symptomatik und Therapie

Beim Morbus Crohn handelt es sich um eine chronische, transmurale Entzündung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen kann. Charakteristisch ist ein diskontinuierlicher Befall der Schleimhaut. Befallen sein können sämtliche Abschnitte des Verdauungstrakts vom Mund bis zum Enddarm, bevorzugt jedoch das terminale Ileum und das Kolon (Abb. 1-3). Es findet sich beim Morbus Crohn ein komplexes Krankheitsbild, das durch verschiedene intestinale Komplikationen (Fisteln, Abszesse, Stenosen des Darmlumens mit Gefahr der Ileusentwicklung) und extraintestinale Manifestationen (Arthralgien, Arthritiden, Erythema nodosum, Iridozyklitis) gekennzeichnet ist. Eine Heilung gelingt weder medikamentös noch chirurgisch. Die Therapie zielt vielmehr unspezifisch auf eine Reduktion des Entzündungsgeschehens ab, um die Symptome zu lindern und die Anzahl akuter Schübe zu verringern. [26]

Morbus Crohn - Befallsmuster

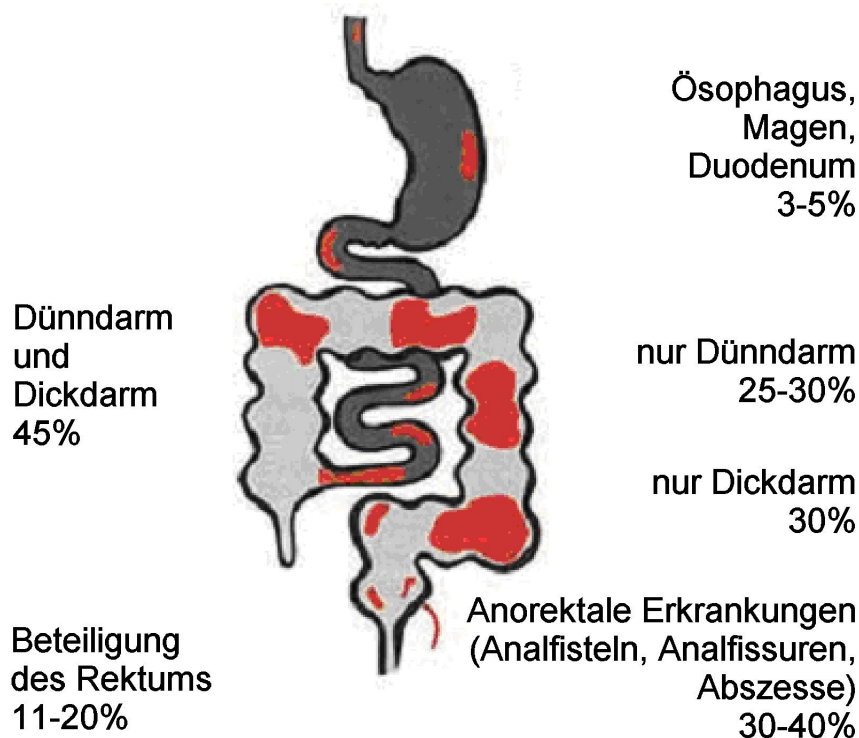


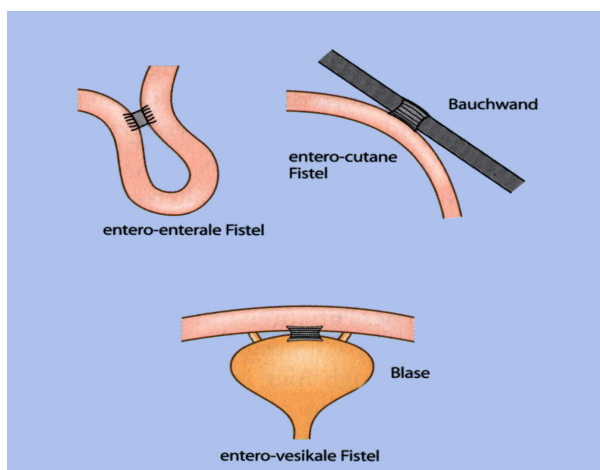
Abb. 1-3: Morbus Crohn – Befallsmuster (Quelle: www.hdm-stuttgart.de)

1.3 Fisteln als klinisches Problem beim Morbus Crohn

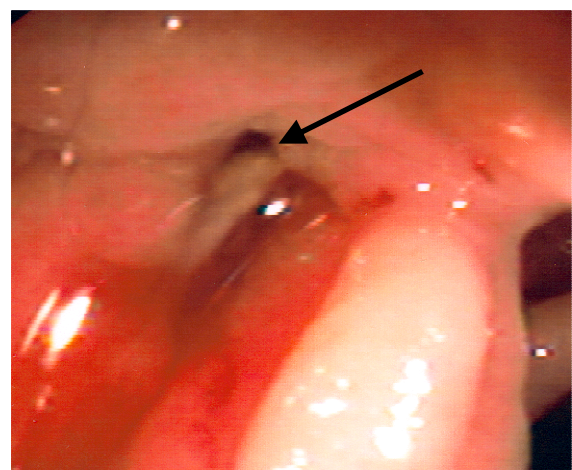
1.3.1 Allgemeines zu Fisteln beim Morbus Crohn

Neben Stenosen stellen vor allem Fisteln ein häufiges und kompliziertes Problem bei Patienten mit Morbus Crohn dar. In der Literatur wird über eine Inzidenz von 17% bis 50% berichtet. [27-30] Populationsbasierte epidemiologische Studien bestätigen diese Zahlen. [31,32] Eine amerikanische Untersuchung zeigte, dass die kumulative Inzidenz für Fisteln nach 10 Jahren bei 33% und nach 20 Jahren bei 50% liegt. [33] Bei Patienten mit einem starken Entzündungsbefall im Kolon, insbesondere mit Beteiligung des Rektums, kann ein vermehrtes Auftreten perianaler Fisteln beobachtet werden. Dieser Typus ist mit 54% der Fistelmanifestationen am häufigsten, 23% der Patienten bekommen ihn im Verlauf der Erkrankung. In 10% der Fälle sind perianale Fisteln das initiale Symptom eines Morbus Crohn, wobei sie dem eigentlichen intestinalen Auftreten der Erkrankung um mehrere Jahre vorangehen können. [34-36]

24% aller Fisteln haben einen entero-enterischen Verlauf (Abb. 1-4). Sie verbinden zwei Darmsegmente untereinander und sind oft schwer zu diagnostizieren. Weitere Arten von Fisteln können eine Verbindung zwischen dem Darm und anderen Organen, wie z. B. der Blase (entero-vesikal), der Bauchwand (entero-kutan) oder der Vagina (entero-vaginal) herstellen. [37-39]



A)



B)

Abb. 1-4: A) zeigt mögliche Fistellokalisierungen bei Morbus Crohn (Quelle: „Praxis der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen - Eine Fibel für den Hausarzt“, 2001, S. 17, Reinshagen M.)

B) zeigt eine endoskopische Aufnahme einer Fistel bei Morbus Crohn (von Prof. Dr. Dr. G. Rogler zur Verfügung gestellt)

Fisteln bedeuten für betroffene Patienten eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität und gravierende soziale Probleme. Gründe hierfür sind unter anderem Schmerzen, rezidivierende Harnwegsinfektionen und Flüssigkeitsabsonderungen aus dem Fistelsystem (Bauchwand, Perianalregion, Vagina). Entero-enterische Fisteln können Ursache einer Malabsorption sein. [40] Perianale Fisteln sind häufig mit der Formation von Abszessen assoziiert. [28]

1.3.2 Therapiemöglichkeiten und Heilungschancen der Fisteln

Obwohl Fisteln eine häufige Komplikation beim Morbus Crohn darstellen, gibt es nach wie vor keine effektiven Therapiemöglichkeiten. So haben trotz Therapie 34% aller Patienten rezidivierend Fisteln, bei nur einem Drittel ist ein dauerhafter Fistelverschluss möglich. [32] 82% der persistierenden Fisteln müssen deshalb früher oder später chirurgisch behandelt werden – verbunden mit einer erhöhten Komplikationsrate und Wundheilungsstörungen. [33] Aber auch eine chirurgische Exzision hat sich nicht als erfolgreich erwiesen. [41-43] Faden-Drainagen (Seton-Drainagen) scheinen wirksamer zu sein, doch auch hier ist eine komplette Heilung selten. [44,45]

Eine häufig durchgeführte konservative Behandlung erfolgt mit dem TNF α -Antikörper Infliximab und führt bei 55% der Patienten zum Verschluss der Fistel (im Vergleich zu 13% bei Placebo), dies jedoch nur für einen Zeitraum von drei Monaten. [36,46]

1.3.3 Pathogenese der Fistelentstehung beim Morbus Crohn

Die Pathogenese der Fistelentstehung ist immer noch ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass sich Fisteln aus einer lokalen Entzündungsreaktion entwickeln. [36,37] Dafür sprechen Erfolge durch die aktuell angewendete medikamentöse Therapie, die auf einer Behandlung mit Antibiotika (Metronidazol, Ciprofloxacin) oder Immunsuppressiva (wie Azathioprin, Cyclosporin A, Tacrolimus oder Infliximab) beruht. [28,34,36,40,46-48] Dies deutet auf eine Rolle von Bakterien und Entzündungsmediatoren bei der Fistelentstehung hin. Dabei ist aber noch unklar, warum bei einzelnen Patienten an bestimmten Lokalisationen diese Faktoren über die reine Entzündung hinaus zu einer Fistelung führen können. Die Vermutung, dass noch weitere, bisher unbekannte Faktoren zur Fistelentstehung beitragen, liegt

jedoch nahe, da diese antibakterielle und anti-inflammatorische Therapie nur in 20 - 30% zu einem permanenten Fistelverschluss führt. Gedacht werden muss auch an einen evtl. vorhandenen, erhöhten Druck im Darmlumen, der eine Rolle spielen könnte. Dafür würde die häufige Assoziation von Stenosen und Fisteln sprechen. [49,50]

1.3.4 Histologische Charakterisierung von Fisteln beim Morbus Crohn

In einer detaillierten histologischen Untersuchung durch unsere Arbeitsgruppe konnten neue Erkenntnisse über die Struktur und den zellulären Aufbau von Fisteln bei Morbus Crohn-Patienten gewonnen werden: [51]

Es zeigte sich, dass alle Fisteln eine zentrale Fissur besaßen, die durch die Lamina propria und die Muscularis mucosae tief in das unterliegende Gewebe reichte. Alle Fisteln wurden von einem Granulationsgewebe mit Histiozyten und einem dichten Netzwerk von Kapillaren begrenzt. 27,4% der Fisteln (im Gegensatz zu 31% der Fisteln bei Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung) zeigten ein „Fistelepithel“ mit als solchen erkennbaren Epithelzellen, bei denen Tight junctions und eine Basalmembran zu sehen waren.

Die „nicht epithelialisierten“ Morbus Crohn-Fisteln, die mehr als 2/3 ausmachten, waren von einer dünnen Schicht Myofibroblasten-ähnlicher Zellen mit Gap junctions ausgekleidet. Diese formten an einigen Stellen eine neue Basalmembran. Morphologisch konnte in einigen Fällen auch eine Zone abgegrenzt werden, in denen das normale Epithel in diese „Fibroblasten“-Schicht überzugehen schien.

Entscheidende Unterschiede zwischen Morbus Crohn- und Nicht-Morbus Crohn-Fisteln zeigten sich immunhistochemisch in Bezug auf die zelluläre Komposition im Randbereich der Fisteln. Diese Unterschiede waren unabhängig von Fistellokalisation und Tiefe der Infiltration. So fanden sich bei Morbus Crohn-Fisteln in der inneren Fistelwand viele CD45R0 positive T-Lymphozyten, dann ein Band von CD68 positiven Makrophagen und schließlich im äußeren Bereich ein dichtes, zellreiches Infiltrat von CD20 positiven B-Lymphozyten.

Bei Fisteln von Patienten, die keine chronisch entzündliche Darmerkrankung hatten, zeigte sich innen eine starke Infiltration durch CD68 positive Makrophagen und in den äußeren 2/3 der Fistelwand eine Infiltration mit CD45R0 positiven T-Lymphozyten. Es fanden sich nur wenige CD20 positive B-Lymphozyten.

1.4 Epithelial-Mesenchymale Transformation (EMT)

1.4.1 Bedeutung und Vorkommen der EMT

Die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) ist ein fundamentaler Prozess bei der Morphogenese multizellulärer Organismen. Schon für die frühesten Entwicklungsschritte, wie zum Beispiel die Bildung des Mesoderms im Verlauf der Gastrulation oder bei der Neurulation, ist sie unabdingbar. Auch während der Entstehung der Herzklappen, des Muskel- und Skelettsystems, der meisten kraniofaziellen Strukturen und bei vielen weiteren Entwicklungsprozessen spielt sie eine wichtige Rolle. [52-54]

Der „umgekehrte“ Vorgang, nämlich eine mesenchymal-epitheliale Transformation (MET) ist ebenfalls möglich und tritt während der Somitogenese, der Nierenentwicklung und der Bildung des Coeloms (der sekundären Leibeshöhle) auf. [55]

Die EMT, die als erstes von Entwicklungsbiologen in den frühen 80er Jahren des 20. Jahrhunderts erkannt wurde, wird aktuell vor allem im Zusammenhang mit der Progression und Metastasierung von Karzinomen, bei Wundheilungsstörungen und bei Erkrankungen, die durch fibrosierende Vorgänge gekennzeichnet sind, diskutiert. [56-58]

Besonders ihre Beteiligung bei der Nierenfibrose ist zurzeit ein Schwerpunkt verschiedener Forschungsgruppen. [59] Die Gruppe um Masayuki Iwano konnte zum Beispiel in einem Tiermodell zeigen, dass über ein Drittel der interstitiellen Fibroblasten in der Niere, den Hauptmediatoren einer renalen Fibrose, im Zuge einer EMT aus tubulärem Epithel entstanden sind. [60] Auch bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose scheint EMT beteiligt zu sein [61,62] und eine Rolle bei der Leberzirrhose wird diskutiert. [63]

In den letzten Jahren wiesen Daten zudem auf einen Zusammenhang von EMT bei Entzündung und Progression von malignen Prozessen hin: Huber et al., sowie Bates et al. zeigten, dass der pro-entzündliche Transkriptionsfaktor NF- κ B für die Induktion und Unterhaltung von EMT in Brustkarzinom- bzw. Kolonkarzinomzellen essentiell ist. [64,65] Beim aggressiven Kolonkarzinom wird die EMT mittlerweile sogar als prognostischer Indikator angesehen. [66]

Aktuelle Daten sprechen für das Vorliegen einer EMT auch bei weiteren malignen Prozessen, wie z. B. dem Magenkrebs oder dem Prostatakarzinom. [67,68]

Zu einer Beteiligung der EMT bei den Wundheilungsstörungen des Morbus Crohn existieren bis jetzt keine Daten.

1.4.2 Charakterisierung und Ablauf der EMT

Die EMT stellt einen Vorgang dar, bei dem sich desaggregierte Epithelverbände mit einer erhöhten Beweglichkeit neu formieren (siehe Abb. 1-5). Epithel in dieser Übergangsphase verliert seine Polarität, seine Zonulae adhaerentes, Tight junctions, Desmosomen und Zytokeratin-Filamente, rearrangiert seine F-Aktin-Stressfasern und bildet Filopodien oder Lamellipodien aus. [69] Das Ergebnis dieses Vorgangs sind mesenchymale Zellen, die keine Basallamina besitzen und nur fokale Kontakte untereinander ausbilden. Diese Zellen zeigen in Kultur eine spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Morphologie, exprimieren mesenchymale Proteine und sind stark beweglich, was *in vivo* jedoch nicht immer der Fall sein muss. [55] Solche phänotypischen Veränderungen erfordern eine molekulare Re-Programmierung der Epithelzellen.

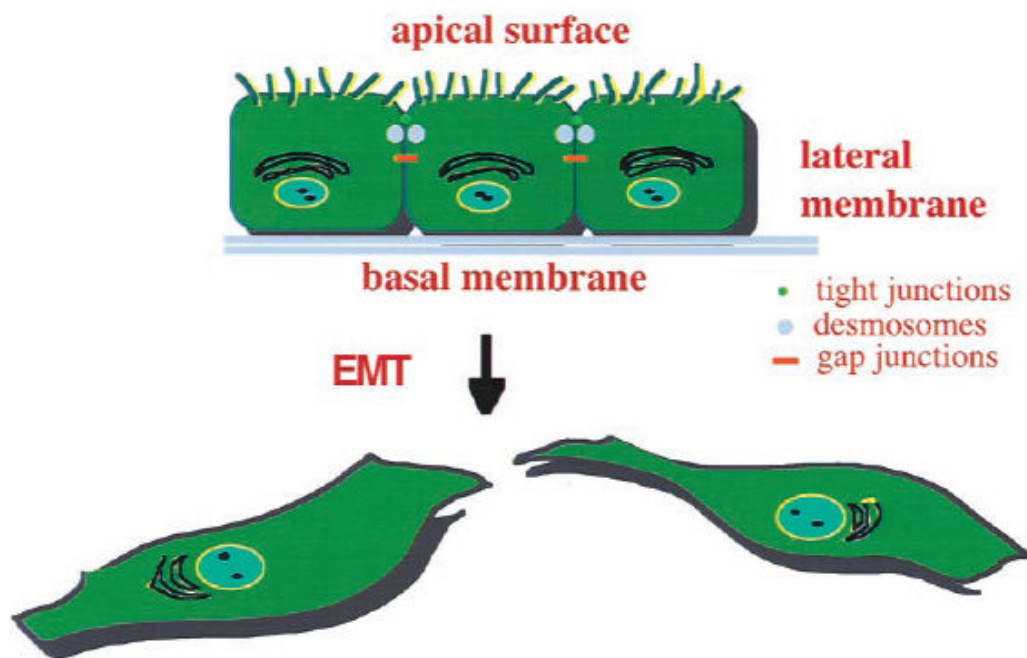


Abb. 1-5: Die EMT induziert bedeutende Veränderungen der Zellmorphologie und der Zellkontakte. Die schematische Zeichnung verdeutlicht den Verlust der interzellulären Verbindungen und die Veränderung der Zellform im Laufe der EMT. (in Anlehnung an: [53])

Es wurden verschiedene auslösende Faktoren einer EMT in unterschiedlichen Geweben beschrieben. Voraussetzung scheint häufig eine Auflösung der Basalmembran durch Metalloproteinasen oder andere Matrix-degradierende Enzyme zu sein. [59,70,71] Untersuchungen zeigten, dass die lokale Expression von Transforming growth factor beta (TGF- β), Epidermal growth factor (EGF), Insulin-like growth factor II (IGF II) oder Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) eine EMT über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren und anschließende Aktivierung spezifischer Kinasen initiieren oder unterstützen kann. [72-74] Der TGF- β -Effekt wird dabei typischerweise entweder über eine Smad-abhängige Regulation der Transkription oder alternativ, z. B. über den p38-MAP-Kinase-, den RhoA- oder andere Signalwege vermittelt. [75]

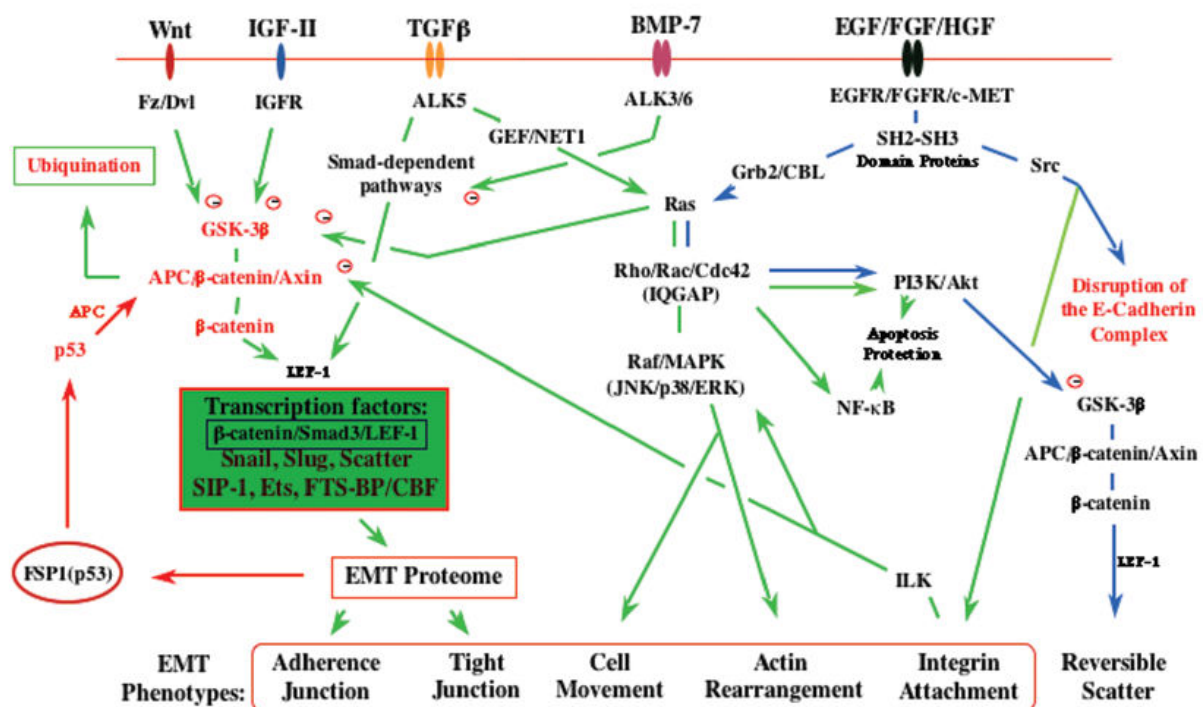


Abb. 1-6: Die epitheliale Plastizität kann zu klassischer EMT (Verlust der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verankerung, Aktin-Rearrangement, Zuwachs an Zellmobilität) führen. EMT wird reguliert durch Liganden-induzierbare Kinase-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die wiederum GTPasen, Smads, PI3Kinase, MAP-Kinasen, und die Verfügbarkeit von β -Catenin zur Koaktivierung von LEF im Zellkern modulieren. Dies führt zu spezifischen Modifikationen der Transkription und zu spezifischen Transkriptionsfaktoren (Snail, SIP1, Ets, und FTS-BP/CarG box binding factor). Jedes spezifische Epithel weist nur einige dieser Signalwege auf. Für das intestinale Epithel sind diese Wege bisher unzureichend untersucht (in Anlehnung an: [69]).

Allgemein werden bei der EMT nach Bindung eines Liganden an die entsprechenden Rezeptoren zunächst Tyrosin-Kinasen, sowie später verschiedene Signalwege, wie zum Beispiel GTPasen der Ras-Superfamilie, Rho, Rac oder c-Src aktiviert. [53,76] Dies führt zur Aktivierung des sog. EMT-Transkriptosoms. [77] Ausdruck dieser Vorgänge ist häufig ein vorübergehender Anstieg der Expression von β -Catenin und Lymphoid enhancer factor (LEF), die dann in den Zellkern transportiert werden, sowie eine Suppression der E-Cadherin-Expression. [69,78] Gerade letzteres ist wahrscheinlich eines der Hauptereignisse bei der EMT, da E-Cadherin für die Aufrechterhaltung eines epithelialen Phänotyps äußerst wichtig zu sein scheint. [78] Die EMT geht zudem mit der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren einher, zu denen unter anderem die Zinkfinger-Proteine der Snail-Superfamilie (Snail, Slug und Scratch) zählen. [69]

Tabelle 1-1 gibt eine Anzahl bisher identifizierter Faktoren wieder, die bei der EMT induziert, supprimiert bzw. transloziert werden. In Abbildung 1-6 sind verschiedene Signalwege aufgezeichnet, die bei der EMT eine Rolle spielen.

Tabelle 1-1: Proteine, die durch oder während der EMT in Epithelzellen induziert oder supprimiert werden, deren Aktivität gesteigert wird oder die im Kern akkumulieren. Funktionelle *in vitro* Marker. (in Anlehnung an [69,79])

Induziert während EMT	Supprimiert durch EMT	Funktionelle <i>in vitro</i> Marker
Snail1 (Snail)	E-Cadherin	Verstärkte Migration
Snail2 (Slug)	β-Catenin	Verstärkte Invasion
Scratch	Desmoplakin	Verstärkte Zerstreuung (Scattering)
SIP1	Muc-1	
E47	ZO-1	Widerstand gegen Anoikis
Ets	Syndecan-1	
FTS binding protein	Zytokeratine	
FSP1	Okkludin	
TGF-β		
Kollagen Typ-I, Typ-III		
MMP-2, -3, -9		
α-SMA	Aktivitätssteigerung	Akkumulation im Kern
Fibronectin	ILK	β-Catenin
FGF-1, -2, -8	GSK-3β	Smad-2/3
PAI-1	Rho	NF-κB
Vimentin		Snail1 (Snail)
Integrin αVβ6		Snail2 (Slug)
Twist		Twist

1.4.3 EMT bei Karzinomen und Fibrose

Auf dem Gebiet der Onkogenese wird die Bedeutung der EMT und der dabei ablaufenden Vorgänge in besonderem Ausmaß deutlich. Denn zum einen gibt es Nachweise, dass viele EMT-Regulatoren die Bildung von Tumoren und deren Metastasierung steigern können. [56] Zum anderen werden EMT-Marker meist nur an den Außengrenzen eines Tumors, nicht jedoch in seiner Zentralregion gefunden. [79] Zusammengefasst verdeutlichen beide Punkte, dass die EMT mit der Tumorentwicklung in Beziehung steht und Einfluss auf die Invasivität und Aggressivität eines solchen besitzt. [79]

Aktuell nimmt man an, dass Tumorzellen, die weder invasive noch metastasierende Eigenschaften besitzen, im Zuge einer EMT Fähigkeiten erlangen, die ihnen erlauben, sowohl umgebendes Gewebe zu infiltrieren, als auch in entfernte Organe zu metastasieren. [79] Im Verlauf einer solchen Umbildung verlieren die Zellen ihre epithelialen Merkmale, während sie gleichzeitig mesenchymale Eigenschaften ausbilden. Dieser Vorgang geht nicht abrupt sondern kontinuierlich vonstatten, so dass „metastabile“ Zwischenstadien entstehen, in denen die Zellen Marker beider Phänotypen aufweisen (siehe Abb. 1-7). [79]



Epitheliale Zellen	„Metastabiles“ Zwischenstadium	Mesenchymale Zellen
Adhaerens Junctions Tight Junctions Desmosomen Apiko-basale Polarität Ortsständig Zytokeratine E-Cadherin	Restliches E-Cadherin Zellgruppen-Bildung Membran-Erweiterung Polarität? Bewegungen in der Fläche? Zytokeratine <u>und</u> Vimentin Nukleäres β -Catenin	Keine Junctions Focale Adhaesionen ECM-Ablagerungen Anoikis-Resistent Motil und Invasiv Front-back-Polarität Vimentin/SMA

Abb. 1-7: „Metastabiles“ Zwischenstadium von Zellen im Verlauf der EMT

Studien konnten einen hybriden Zelltyp identifizieren, der sowohl epitheliale als auch mesenchymale Charakterzüge besitzt. Die Zellen in diesem „metastabilen“ Zwischenstadium werden hier in Beziehung zu ihrem epithelialen und mesenchymalen Gegenstück beschrieben. (in Anlehnung an: [79])

Man stellt sich die Entstehung von Metastasen nun so vor, dass die im invasiven Außenbezirk des Primärtumors ablaufende EMT undifferenzierte, mesenchymale Zellen hervorbringt. Diese können sich an anderen Stellen des Körpers durch MET wieder in differenzierte Epithelzellen mit hoher Wachstumsrate umwandeln und so Metastasen bilden (siehe Abb. 1-8). [80] Für diese Hypothese spricht, dass Sekundärtumoren eine ähnliche Histologie wie der jeweilige Primärtumor aufweisen. [81] Der Nachweis von Stammzell-Markern in den durch EMT entstandenen Zellen unterstreicht deren Potenz bei der Metastasierung. [79,80,82] Zudem konnten Brabletz et al. zeigen, dass Metastasen von Kolonkarzinomen erneut E-Cadherin exprimieren und zuvor im Kern lokalisiertes β -Catenin wieder ins Zytosol transloziert wird. Diese Beobachtung spricht für das Vorliegen einer MET. [83]

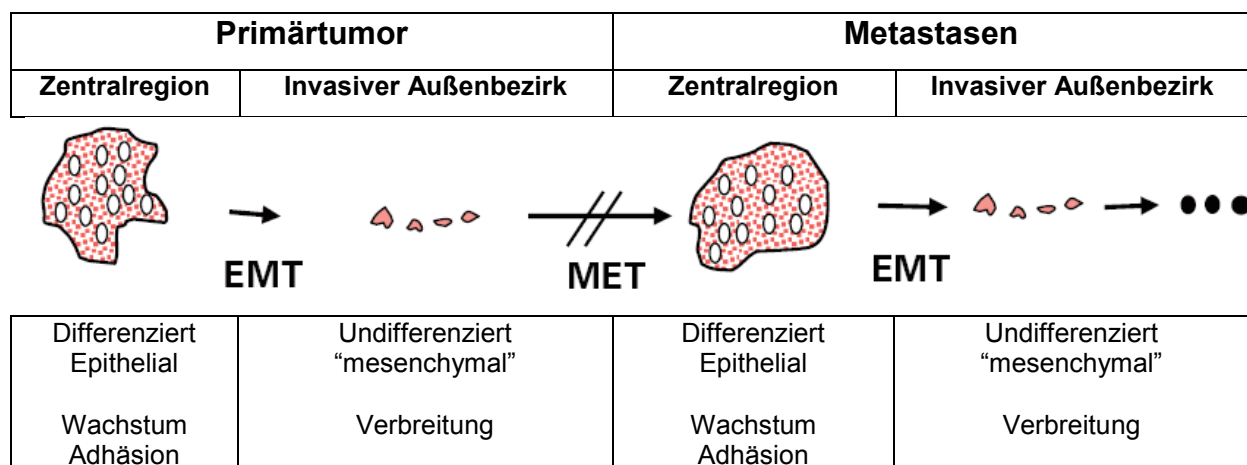


Abb. 1-8: Zelleigenschaften und Stattfinden der EMT und MET im Verlauf der Metastasierung

Dynamische Veränderungen des Phänotyps der Tumorzellen durch vorübergehende EMTs und METs führen zu einem permanenten Wechsel zwischen Tumorwachstum und Verbreitung von Tumorzellen. In der Zentralregion von Primärtumor und Metastasen zeigen sich jeweils differenzierte, epitheliale Zellen, die an der invasiven Front ihre Polarität verlieren und einen „mesenchymalen“ Phänotyp annehmen. (in Anlehnung an: [80])

Fibrosierende Organveränderungen bilden eine weitere Gruppe von Erkrankungen, bei denen die Rolle der EMT immer deutlicher in den Vordergrund rückt. Ein Überschuss an Kollagen und anderen Matrixkomponenten, sowie eine Akkumulation von Fibroblasten führen an Orten chronischer Entzündung zu Narbenbildung und fortschreitender Gewebeerstörung. [84]

Die bei diesen Vorgängen beteiligten Fibroblasten stammen zu einem großen Teil aus dem Knochenmark. Jedoch hat sich gezeigt, dass sie auch durch EMT entstehen können. Bei der Nierenfibrose z. B. machen letztere über ein Drittel aus. [60,69,85] Untersuchungen ergaben, dass verletzte Epithelien in diesem Organ entweder im Tubulus zugrunde gehen oder sich in Fibroblasten umwandeln können. [84]

Weitere Experimente, welche die Bedeutung der EMT bei fibrosierenden Erkrankungen verdeutlichen, wurden mit BMP7 durchgeführt. BMP7 besitzt antagonistische Wirkung in Bezug auf TGF- β , welches einen bedeutenden Induktor der EMT darstellt. [86,87] Es wurde berichtet, dass BMP7, neben seinem migrationshemmenden Effekt auf Fibroblasten, fibrosierende Erkrankungen *in vitro* und *in vivo* verhindern kann. [86,88]

1.5 Hypothese, Arbeitsziele

Während am Ursprung von Fisteln darmlumenwärts ein typisches Zylinderepithel aufzufinden ist, werden Fisteln bei Morbus Crohn-Patienten zumeist von mesenchymal imponierenden Zellen ausgekleidet, die aber in der Lage sind, eine Art Basalmembran zu bilden (siehe Kapitel 1.3.4). Bisher wurde vielfach angenommen, dass es sich hier um Fibroblasten handelt, die in den Bereich einer Ulzeration mit dem Ziel der Wundheilung einwandern, um einen Defekt zu verschließen und bei Störungen der epithelialen Wundheilung eine Art „Ersatzepithel“, das seinen Ursprung in der Lamina propria oder in der Muscularis mucosae hat, bilden. Diese Hypothese ist jedoch bisher praktisch nicht belegt.

In dieser Arbeit sollte nun eine andere Hypothese überprüft werden: Da Übergangszonen von Zylinderepithel zu mesenchymal imponierenden Zellen ohne klaren Bruch oder ohne eine klare Grenze zwischen den Zelltypen zu finden sind, besteht die Annahme, dass die luminale Fistelauskleidung durch epithelial-mesenchymale Transformation entsteht und dass dieser Prozess auch eine zentrale Rolle bei der Fistelentstehung spielt, da er den Epithelzellen durch eine „pseudomaligne“ Mobilität die Fähigkeit verleiht, in tiefere Schichten der Darmwand vorzudringen. Um diese Hypothese zu untersuchen, sollte folgender Arbeitsplan ausgeführt werden:

1. Mit Hilfe von Immunhistochemien sollten an Fisteln von Morbus Crohn-Patienten die Zellen dieser Übergangszone charakterisiert werden. Dazu sollte die Expression bestimmter Intermediärfilamente detektiert werden, die entweder nur in Epithelzellen (Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20) oder nur in Mesenchymzellen (Vimentin) vorkommen.
2. In einem nächsten Schritt sollte bei den Fisteln immunhistochemisch die Expression von Proteinen untersucht werden, die im Verlauf einer epithelial-mesenchymalen Transformation entweder supprimiert (E-Cadherin, β -Catenin) oder induziert (Integrin $\beta 6$, TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$) werden.

-
3. Um Myofibroblasten aus den Fistelgängen noch genauer untersuchen zu können, sollten sie isoliert und in Kultur gebracht werden. Zum Vergleich sollte dies ebenfalls mit Myofibroblasten aus Stenosen von Morbus Crohn-Patienten und mit Myofibroblasten aus rein entzündlich veränderten Darmabschnitten von Morbus Crohn-Patienten geschehen. Die Zellen sollten dann lysiert werden und durch Western-Blot-Analysen ein Nachweis von EMT-assoziierten Proteinen in diesen Fibroblastenzelllysaten erfolgen. Untersucht werden sollten folgende Proteine:
 α -SMA, Vimentin, TGF- β 1, TGF- β 2, E-Cadherin und Zytokeratin 8
 4. Um das Ergebnis des Zytokeratin 8-Western Blots noch weiter zu verifizieren, sollte noch eine Immunozytochemie durchgeführt werden: Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sollte dieses Protein in einer Kultur von Myofibroblasten aus dem Fistellumen eines Morbus Crohn-Patienten angefärbt werden.

2 MATERIALIEN UND GERÄTE

2.1 Chemikalien und Reagenziensätze (Kits)

2.1.1 Immunhistochemie

AK-Verdünnungsmedium	Ventana Medical Systems, Tucson/USA
Amplifikationskit	Ventana Medical Systems, Tucson/USA
Antigen-Retrieval Solution	R&D Systems, Wiesbaden
APK Wash 10x Solution	Ventana Medical Systems, Tucson/USA
Detektionskit iView™ DAB	Ventana Medical Systems, Tucson/USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycergel	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Hämatoxylin Gegenfärbung	Ventana Medical Systems, Tucson/USA
Liquid Coverslip™ (low)	Ventana Medical Systems, Tucson/USA
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Protease I	Ventana Medical Systems, Tucson/USA
Tris	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Zitronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt

Antikörper: siehe Methodenteil

2.1.2 Zellkultur

Amphotericin	Biochrom, Berlin
Ciprobay® 200	Bayer, Leverkusen
Deoxyribonuclease	Roche Diagnostigs GmbH, Mannheim
DMEM, 4,5 g/l Glucose	PAA Laboratories GmbH, Linz/Österreich
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
FCS	PAN Biotech, Aidenbach

Gentamycin	Biochrom, Berlin
HBSS	Invitrogen Coporation, Carlsbad/USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kollagenase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
MEM-Vitamine	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Nichtessentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}	Invitrogen Coporation, Carlsbad/USA
PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Invitrogen Coporation, Carlsbad/USA
Penicillin/Streptomycin-Mischung	PAA Laboratories GmbH, Linz/Österreich
Trypsin ohne EDTA	Biochrom, Berlin

2.1.3 Western Blotting

Acrylamid-Mix	Protogel, Hull/GB
APS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
BCA-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Butanol	Merck, Darmstadt
Complete Mini Tabletten	Boehringer, Mannheim
Kupfer (II) Sulfat Pentahydrat, 4% Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Desoxycholsäure	Boehringer, Mannheim
ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit	Amersham, Buckinghamshire/GB
EDTA	Merck, Darmstadt
Glycerin	Biorad, München
Magermilchpulver	Glücksklee, Frankfurt a. M.
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Precision Plus Protein™ (Marker)	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Rainbow-Marker	Amersham, Buckinghamshire/GB
Re-Blot Plus Western Blot Recycling Kit	Chemicon International, Temecula/USA
SDS	Fluka, Neu-Ulm

TEMED	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tween 20	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Primärantikörper: siehe Methodenteil

Sekundärantikörper:

Kaninchen anti-Maus IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
-----------------------------	--------------------------------------

Positivkontrollen:

E-Cadherin: Primärzellkultur (PE 447 0')	Primäre humane Kolonepithelzellen
TGF- β 1: Human TGF- β 1	R&D Systems, Wiesbaden
TGF- β 2: Recombinant Human TGF- β 2	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.4 Immunozytochemie

Aceton	Merck, Darmstadt
Eindeckelmedium (wasserlöslich)	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Universal DAKO-APAAP-Kit	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

Primärantikörper: siehe Methodenteil

Isotypkontrolle: siehe Methodenteil

2.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien

96-Well-Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, Solingen
Absaugpipetten	VWR, Darmstadt
Cell-Scraper	Corning Incorporated, Corning/USA
Chamber-slides, 2 well	Brand, Wertheim
Deckgläser 24 x 60 mm	Laborcenter, Nürnberg
Einmal-Pipetten, steril	Corning Incorporated, Corning/USA
Einmal-Skalpell	pfm, Köln
Fettstift	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Gel (1,0mm)-Kassette	Novex, San Diego/USA
Gel-Kämme, 10 well	Novex, San Diego/USA
Hyperfilm ECL™	Amersham Life Science, Braunschweig
Kanülen	Becton-Dickinson, San Jose/USA
Kapillarspritzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Milliporeeinsätze	Millipore Corporation, Bedford/USA
Nitrozellulosemembran	Novex, San Diego/USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Petrischalen	Falcon, Heidelberg
Pinzetten	Labor Schubert & Weiß, Iphofen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Super-Frost® Plus (Objektträger)	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Whatman-Filterpapier	Whatman, Maidstone/GB
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning Incorporated, Corning/USA

2.3 Laborausstattung, Geräte

Analysewaage, sartorius analytic A120S	Sartorius, Göttingen
Autoclav sanoclav	Wolf, Geislingen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Curix 60 (Entwicklermaschine)	AGFA, Leverkusen
Digitale Bildverarbeitungsanlage	Visitron Systems, München
Durchlichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Electrophoresis Power Supply	Amersham, Buckinghamshire/GB
ELISA-Reader	MWG Biotech, Denkendorf
Filmkassette	Olympus, Stuttgart
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Lamin Air Sterilbank	Heraeus, Hanau
Liquitherm FV, Heizbad	Labora Mannheim, Mannheim
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Mikroskop	Olympus, Stuttgart
Mikrotom	Mikrom GmbH, Walldorf
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Millipore Wasserfiltrationsanlage	Millipore, Eschhorn
NexES [®] , Immunhistochemie-Färbeautomat	Ventana Medical Systems, Tucson/USA
ph-Meter	Beckmann, München
Pipetboy acu	Tecnomara, Ruhberg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelapparat	peqlab, Erlangen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Vortex-Mixer	Heidolph, Kehlheim
XCell II [™] Mini-Cell Modul	Novex Elektrophoresis GmbH, Frankfurt
Zentrifuge, Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 1,0R	Heraeus, Hanau

2.4 Nährmedien, Puffer, Gele und Lösungen

2.4.1 Nährmedien

Zellkulturmedium für primäre Fibroblasten

500 ml	Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose 4,5 g/l
50 ml	Fötales Kälberserum (FCS)
5,0 ml	MEM-Vitamine, 100x
5,0 ml	Nichtessentielle Aminosäuren (NEA), 100x
5,0 ml	Penicillin/Streptomycin, 10 mg/ml
2,0 ml	Ciprofloxacin, 2 mg/ml
500 µl	Gentamycin, 50 mg/ml
500 µl	Amphotericin B, 1 mg/ml

2.4.2 Allgemeine Puffer

Citratpuffer pH 6,0

2,1 g Zitronensäuremonohydrat 0,1 M
ad 1,0 l Aqua bidest.
Einstellen des pH-Wertes mit NaOH auf 6,0

Citratpuffer pH 7,3

Lösung A

2,1 g Zitronensäuremonohydrat 0,1 M
ad 100 ml Aqua bidest.

Lösung B

29,41 g Natriumcitrat
ad 1,0 l Aqua bidest.

Citratpuffer pH 7,3

1,0 ml Lösung A
49 ml Lösung B
ad 0,5 l Aqua bidest., pH überprüfen

TBS-Puffer (1x)

20 ml Tris 0,5 M, pH 8
20 ml NaCl 5 M
ad 1,0 l Aqua bidest.
Einstellen des pH-Wertes mit 1 M HCl auf 7,6

2.4.3 Protein-Isolierung

RIPA-Puffer (2x)

5,0 ml	Tris 1 M
3,0 ml	NaCl 5 M
1,0 g	Desoxicholsäure
1,0 ml	Triton X100
500 µl	SDS (10%)
ad 50 ml	Aqua bidest.

RIPA-Lysepuffer

1,0 ml	Ripa-Puffer 2x
1,0 ml	Aqua bidest.
300 µl	Proteaseinhibitor (1 Tablette Complete Mini in 1,5 ml Aqua bidest.)

2.4.4 Western-Blotting

Tris-Trenngelpuffer

90,8 g	Tris 1,5 M, pH 8,8
ad 500 ml	Aqua bidest.

Tris-Sammelgelpuffer

30 g	Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
ad 500 ml	Aqua bidest.

Einstellen des pH-Wertes mit 1 M HCl auf 6,8

SDS (10%)

10 g	Natriumdodecylsulfat
ad 100 ml	Aqua bidest.

Ammoniumpersulfat (10%)

100 mg	Ammoniumpersulfat
ad 1,0 ml	Aqua bidest.

Laemmli-Probenpuffer (2x)

25 ml	Tris 0,5 M, pH 6,8
20 ml	Glycerin
40 ml	SDS (10%)
(2,0 ml	β-Mercaptoethanol, wenn erwünscht)
2 mg	Bromphenolblau
ad 100 ml	Aqua bidest.

SDS-Polyacrylamid-Trenngele (6% – 15%)

6%	10%	12%	15%	
5,3 ml	4,0 ml	3,3 ml	2,3 ml	Aqua bidest.
2,0 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml	Acrylamid-Mix (30%)
2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	Tris 1,5 M, pH 8,8
100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	SDS (10%)
100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	Ammoniumpersulfat (10%)
8,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	TEMED

SDS-Polyacrylamid-Sammelgel

3,4 ml	Aqua bidest.
830 µl	Acrylamid-Mix (30%)
630 µl	Tris 1 M, pH 6,8
50 µl	SDS (10%)
50 µl	Ammoniumpersulfat (10%)
5,0 µl	TEMED

Tris-Glycin-Laufpuffer (10x)

29 g	Tris Base
144 g	Glycerin
10 g	SDS
ad 1,0 l	Aqua bidest.

Transfer-Puffer (10x)

60 g	Tris Base
290 g	Glycerin
ad 1,6 l	Aqua bidest.

Wasch-Puffer (TBST)

40 ml	Tris 0,5 M, pH 6,8
40 ml	NaCl 5 M
2,0 ml	Tween
ad 2,0 l	Aqua bidest.

3 METHODEN

3.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation bestimmter zellulärer Oberflächenmarker oder intrazellulärer Proteine in Geweben und Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Allen immunhistochemischen Methoden liegt die Fähigkeit immunreaktiver Antikörper zugrunde, zugehörige Antigene zu erkennen und daran mit einer hohen Affinität zu binden. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann hierbei durch verschiedene direkte oder indirekte Markierungsverfahren sichtbar gemacht werden.

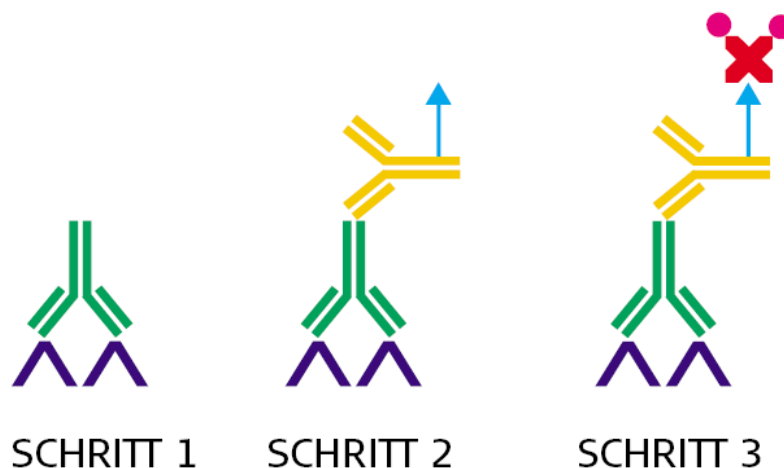


Abb. 3-1: Die drei Schritte der LSAB[®]-Methode bestehen aus Primärantikörper (Schritt 1), biotinyliertem Brückenantikörper (Schritt 2) und Enzym-markiertem Streptavidin (Schritt 3) (in Anlehnung an: Boenisch T.(Hrsg.), „Handbuch: Immunchemische Färbemethoden“, 2003, S. 39)

Für die immunhistochemische Untersuchung der Fistelschnitte (Tabelle 3-1 und 3-2) wurde die LSAB[®] (Labelled StreptAvidin-Biotin)-Methode (Abb. 3-1) ausgewählt, die im Vergleich zur herkömmlichen ABC (Avidin-Biotin Complex)-Methode eine vier- bis achtmal höhere Sensitivität aufweist. [89] Bei beiden Verfahren bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an den Antigen-spezifischen Primärantikörper. Der entscheidende Unterschied liegt im dritten Schritt, in dem bei der LSAB[®]-Methode statt einem Avidin-Biotin-Enzymkomplex enzymmarkiertes Streptavidin eingesetzt wird. Beide Wege schließen mit einer Substrat-Chromogenlösung ab.

Tabelle 3-1: Aufzählung und Charakterisierung der in den Versuchen verwendeten Darm-Fisteln

Nummer	Alter	Geschlecht	Diagnose	Entnahmestelle
02/10430-A8	46	weiblich	M. Crohn	Dünndarm
02/18818-18	67	weiblich	M. Crohn	Dünndarm
02/23964-8	17	männlich	M. Crohn	Linkes Kolon
03/11115-8	24	männlich	M. Crohn	Terminales Ileum
03/14644-15	37	männlich	M. Crohn	Terminales Ileum
03/15381-3	23	weiblich	M. Crohn	Coecum
03/17290-3	20	männlich	M. Crohn	Sigma
03/17290-4	20	männlich	M. Crohn	Sigma
03/2364-4	48	weiblich	M. Crohn	Kolon
03/984-A9	42	weiblich	M. Crohn	Ileum
04/14031-9	24	männlich	M. Crohn	Dünndarm
04/14073-11	40	männlich	M. Crohn	Ileum
04/26491-12	37	weiblich	M. Crohn	Rektum
04/3897-A9	27	weiblich	M. Crohn	Ileum

Tabelle 3-2: Aufzählung und Charakterisierung der in den Versuchen verwendeten Fisteln mit Plattenepithelanteilen

Nummer	Alter	Geschlecht	Diagnose	Entnahmestelle
03/14054-1	71	männlich	M. Crohn	Anal fistel
04/10771-13	39	weiblich	M. Crohn	Anorektaler Übergang
04/27409-1	24	weiblich	M. Crohn	Anal fistel

3.1.1 Paraffinschnitte

Für den immunhistochemischen Nachweis der gewebespezifischen Antigene wurden Präparate mit 2 bis 4 µm Schichtdicke am Mikrotom geschnitten und auf Super-Frost Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden anschließend für 30 Minuten bei 72°C im Trockenschrank inkubiert, dann in absteigender Reihenfolge von Xylol, 100%, 95%, 80% bis zu 70% Ethanol entparaffiniert und gut mit Aqua dest. gespült.

3.1.2 Demaskierung

Zur Demaskierung der Schnitte, also der „Verbesserung“ der Immunreaktivität der formalinfixierten Gewebeantigene, wurde je nach zu detektierendem Antigen eine geeignete Vorbehandlung durchgeführt (Tabelle 3-3):

- Entweder wurden die Objektträger in mit Puffer gefüllten Plastik-Küvetten in der Mikrowelle bei 250 Watt gekocht, danach abgekühlt und gut mit Aqua dest. gespült, oder
- die Objektträger wurden in mit Puffer gefüllten Plastik-Küvetten im Wasserbad inkubiert und anschließend gut mit Aqua dest. gespült, oder
- die Objektträger wurden für 8 Minuten mit Protease inkubiert.

Nach der Demaskierung wurden die Schnitte mit Tris-Puffer gewaschen.

Tabelle 3-3: Verwendete Antikörper, Verdünnungen und Demaskierungsmethoden der jeweiligen Immunhistochemien

Antikörper (Firma, Bestellnummer), Host (Klon), eingesetzte Verdünnung	Demaskierungsmethode, verwendeter Demaskierungspuffer
β-Catenin (St. Cruz, SC-7963) Maus (E-5), monoklonal, 1:50	40 min. bei 90°C im Wasserbad, Citratpuffer pH 6,0
E-Cadherin (St. Cruz, SC-8426) Maus (G-10), monoklonal, 1:75	32 min. kochen in der Mikrowelle, Citratpuffer pH 6,0
TGF-β1 (Acris, DM1047) Maus (TB21), monoklonal 1:200	30 min. kochen in der Mikrowelle, Citratpuffer pH 7,3
TGF-β2 (St. Cruz, SC-90) Kaninchen (V), polyklonal, 1:30	32 min. kochen in der Mikrowelle, Antigen-Retrieval-Solution der Fa. R&D
Zytokeratin 8 (Dako, M0631) Maus (35βH11), monoklonal, 1:50	24 min. kochen in der Mikrowelle, Citratpuffer pH 7,3
Zytokeratin 20 (Progen, 61026) Maus (ITKS20.8), monoklonal 1:10	24 min. kochen in der Mikrowelle, Citratpuffer pH 7,3
Vimentin (Ventana, 760-2512) Maus (3B4), monoklonal, 1:50	8 min. Inkubation mit Protease

3.1.3 Färbeablauf nach *View*-Protokoll

Die Färbungen nach der LSAB[®]-Methode wurden unter Benutzung des automatisierten Immunhistochemie-Systems NexES[®] der Firma Ventana mit deren *View*[™] DAB Paraffin-Detektionskit durchgeführt. Zwischen jedem Schritt wurden die Schnitte mit 41,0°C warmem Tris-Puffer gewaschen und anschließend mit Öl (Liquid Coverslip[™]) beschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Vorgänge wurden, soweit nicht anders erwähnt, bei einer Temperatur von 37,0°C durchgeführt.

Als erstes wurde für vier Minuten *View*-Inhibitor, eine dreiprozentige Wasserstoff-Peroxid-Lösung, aufgetragen, um evtl. vorhandene, endogene Peroxidasen zu neutralisieren. Anschließend wurden die Schnitte für 32 Minuten mit jeweils 100 µl des in AK-Verdünnungsmedium verdünnten Primärantikörpers inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Schnitte ohne diesen. Im nächsten Schritt folgte der in Phosphatpuffer gelöste, gegen den Primärantikörper gerichtete, biotinmarkierte Sekundärantikörper (affinity purified goat-anti-mouse IgG und IgM bzw. goat-anti-rabbit IgG), der für acht Minuten dort belassen wurde. Für die gleiche Zeitdauer konnte dann das *View*-SA-HRP-Reagens einwirken, welches mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin beinhaltet. Zur Farbbildung wurde anschließend eine Peroxidase-Substratlösung aus *View*-DAB (3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) und *View*-H₂O₂ (0,04% - 0,08% Wasserstoffperoxid) benutzt, welche die Schnitte für acht Minuten bedeckte. Zusammen mit dem *View*-Copper-Reagens, einer Kupfersulfatlösung, die für vier Minuten zur Farbverstärkung aufgetragen wurde, ergab sich so eine dunkelbraune, lichtmikroskopisch sichtbare Färbung. Um die mikroskopische Beurteilung zu erleichtern, wurden die Gewebeschnitte für vier Minuten mit Hämatoxylinlösung gegengefärbt, welche die Zellkerne blau markierte. Zur Entfernung des Beschichtungsöls von den Objektträgern, wurden diese dann in eine Küvette mit spülmittelhaltigem Wasser gesteckt und anschließend 10 - 15 Minuten in normalem Leitungswasser gewässert. Letztendlich sind die Schnitte wieder über eine Alkoholreihe, diesmal in aufsteigender Reihenfolge, bis zum Xylol geführt worden um dann mit Glycingelatine und einem Deckglas versiegelt zu werden.

3.1.4 Auswertung, statistische Analyse

Die immunhistochemisch gefärbten Fistelschnitte wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Um eine systematische Auswertung durchführen zu können, wurde die Stärke der Färbung jeweils der Kategorie „nicht vorhanden“ (= 1), „schwach vorhanden“ (= 2) oder „stark vorhanden“ (= 3) zugeordnet. Diese nun auf Ordinalskala-Niveau vorliegenden Daten wurden dann grafisch in Diagramme aufgetragen (Microsoft® Excel) und mit Hilfe ihres Medians verglichen. Unterschiede wurden mittels eines Mann-Whitney-U-Tests auf ihre Signifikanz hin untersucht (verwendete Software: SigmaStat®, Access Softek Inc., San. Rafael/USA).

3.2 Zellkultur

3.2.1 Isolation und Kultur von primären humanen intestinalen Fibroblasten

Alle Versuche in dieser Arbeit wurden mit primären intestinalen Myofibroblasten-Kulturen von Morbus Crohn-Patienten durchgeführt (Abb. 3-2). Dafür wurden Myofibroblasten aus stenosierten Darmarealen, Myofibroblasten aus Fisteln und Myofibroblasten aus rein entzündlich veränderten Abschnitten des Darms isoliert. Alle verwendeten Kulturen sind in Tabelle 3-4 aufgelistet. Die Isolation der intestinalen Myofibroblasten erfolgte über einen Kollagenaseverdau:

Sechs Darmstücke (je ca. 1 mm² groß) wurden in 10 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit 40 µl 0,5 M EDTA (Ethyldiamin-Tetraacetat) für 20 min bei 37°C geschüttelt. Die Epithelzellen wurden in diesem Schritt abgelöst. Der Überstand mit den Epithelzellen wurde verworfen. Zum weiteren enzymatischen Aufschluss wurden je drei Darmstücke mit 250 µl Kollagenase I (4 mg/ml), 30 µl Desoxyribonuklease (10 mg/ml) und 20 µl Hyaluronidase (100 mg/ml) mit 700 µl PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ 30 min bei 37°C stark geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen und der Kollagenaseverdau durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden durch wiederholte Zentrifugation (Biofuge pico, 5 min mit 3500 rpm bei Raumtemperatur) und Resuspension weiter vereinzelt, zweimal mit Fibroblasten-Medium gewaschen und in eine sterile 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Kulturen wurden über Nacht in einer Atmosphäre von 37°C, 10% CO₂

und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Während dieser Zeit adhärten die Fibroblasten.

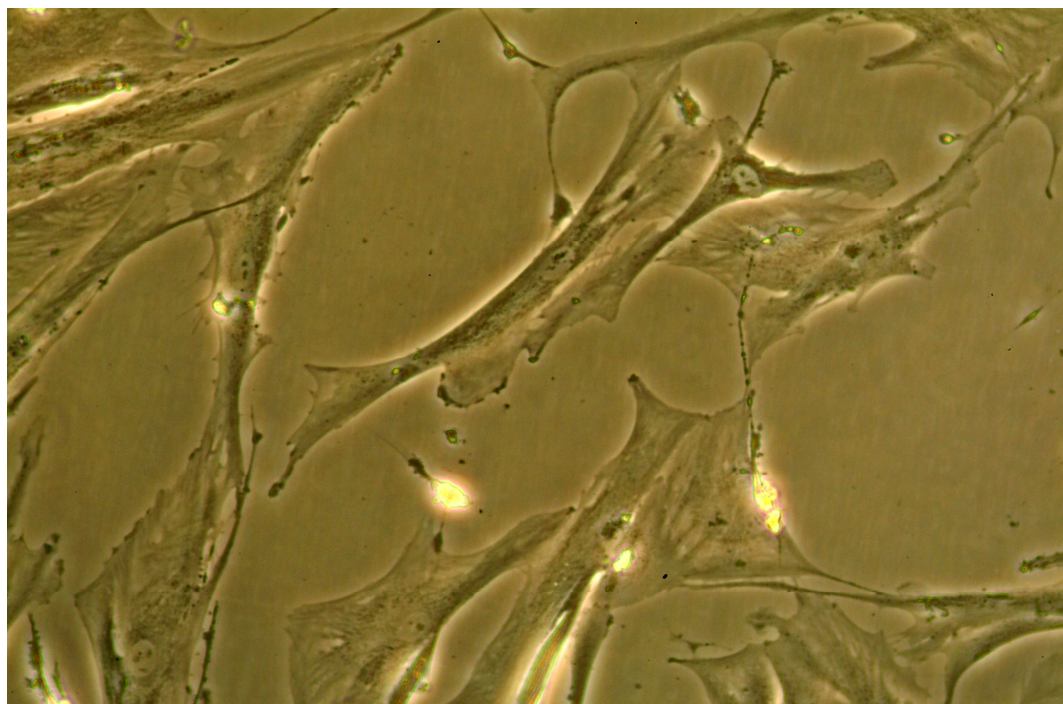


Abb. 3-2: Humane primäre intestinale Morbus Crohn-Myofibroblasten (800fach vergrößert)

Tabelle 3-4: Aufzählung und Charakterisierung der in den Versuchen verwendeten intestinalen Myofibroblasten

Nummer	Alter	Geschlecht	Diagnose	Entnahmestelle	Veränderung
62	28	männlich	Morbus Crohn	Kolon ascendens	Stenose
63	28	männlich	Morbus Crohn	Sigma	Entzündung
67	32	weiblich	Morbus Crohn	Terminales Ileum	Stenose
68	32	weiblich	Morbus Crohn	Kolon transversum	Entzündung
72	26	weiblich	Morbus Crohn	Rectum	Fistel
124	36	weiblich	Morbus Crohn	Coecum	Entzündung
141	50	weiblich	Morbus Crohn	Terminales Ileum	Fistel
149	40	männlich	Morbus Crohn	Kolon ascendens	Fistel
152	46	weiblich	Morbus Crohn	Rectum	Fistel
153	44	weiblich	Morbus Crohn	Rectum	Fistel
204	17	weiblich	Morbus Crohn	Sigma	Stenose

3.2.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein spezielles Medium, bestehend aus DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO verwendet. Die Zellen wurden abtrypsiniert, zentrifugiert und in diesem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in spezielle Einfrierröhrchen gefüllt und über Nacht bei -80°C in einem Einfrierbehälter eingefroren, der ein Abkühlen der Zellen um 1°C pro Minute gewährleistet. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

3.2.3 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch kurzzeitige Wärmebehandlung des Einfrierröhrchens (37°C , 2 min). Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt und einmal abzentrifugiert, um das bei Raumtemperatur als Zellgift wirkende DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in frischem, 37°C warmem Zellkulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt.

3.2.4 Kultur von intestinalen Fibroblasten

Die Fibroblasten aus den Darmbiopsien wurden in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen mit Fibroblastenmedium bei 37°C , 10% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sobald die Zellen dicht genug gewachsen waren, wurde zur Teilung das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation mit 0,5 ml Trypsin bei 37°C . Anschließend wurden die Zellen mit 2,5 ml Medium vom Boden abgespült, in ein 15 ml Tube überführt und 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Medium resuspendiert, auf neue Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:3 bis 1:5 aufgeteilt und erneut im Brutschrank bebrütet. Sollte es der letzte Teilungsschritt vor der Proteinisolation sein, so wurden die Zellen statt auf neue Zellkulturflaschen auf Petrischalen verteilt. Für die Western-Blots und Immunozytochemien wurden Zellen der Generationen 3 – 8 verwendet.

3.3 Western Blotting

Mit Hilfe des sogenannten Western Blotting ist es möglich, Proteine aufzutrennen und anschließend zu identifizieren. Die Proteine werden dazu zuerst in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Dabei formen sie einen Komplex mit SDS (Natriumdodecylsulfat), welches an die hydrophoben Bereiche des Proteins bindet und auf diesem Weg dessen eigentliche Ladung durch negative Ladungen maskiert und es durch Zerstörung der nicht-kovalenten Wechselwirkungen entfaltet. Desweiteren werden intramolekulare Schwefelbrückenbindungen durch Zugabe von β -Mercaptoethanol gelöst und somit zugleich Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zerstört. Die Aminosäureketten liegen anschließend gestreckt und mit SDS beladen vor. Das Polyacrylamid des Gels ist netzartig miteinander verbunden, wobei Maschen des Gels wie ein Sieb wirken, durch das die Proteine hindurchgleiten können. Dabei wandern große Proteine langsamer als kleine. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine auf eine immobilisierende Nitrozellulosemembran geblottet, mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht (Abb. 3-3).

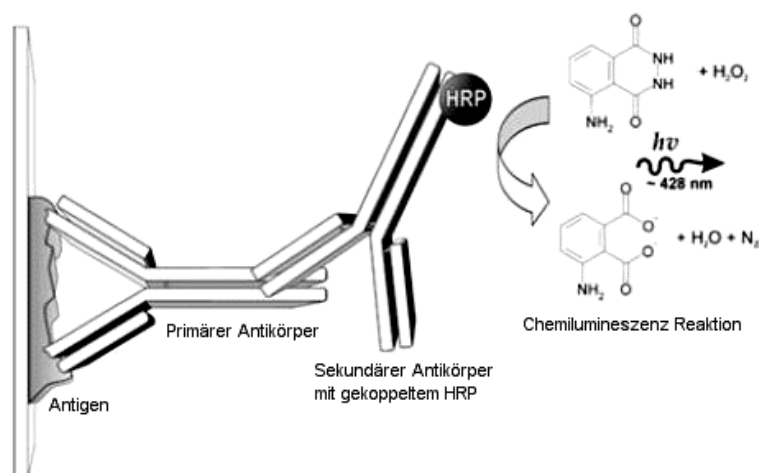


Abb. 3-3: Schema der Immundetektion: Der primäre Antikörper bindet an sein Antigen, welches auf einer Membran fixiert ist. An diesen wiederum bindet der sekundäre Antikörper, der z. B. mit dem Enzym HRP gekoppelt ist. Dieses HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz detektiert werden kann. (in Anlehnung an: Wikipedia, „Western Blot“, 2006)

3.3.1 Zytosolpräparation

Die adhärenenten Zellen in den Petrischalen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um Reste des im Medium enthaltenen FCS zu entfernen und anschließend in 400 - 500 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte eine zusätzliche mechanische Lyse der Zellen durch Abschaben vom Boden der Kulturflasche mit einem sogenannten cell-scraper. Das erhaltene gesamtytosolische Lysat wurde für 5 min bei 14.000 U/min bei 4°C zentrifugiert und der die zytosolischen Proteine enthaltende, klare Überstand in ein neues, vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Proben wurde ein BCA (bicinchoninic acid)-Test verwendet. Bei diesem wird in wässriger alkalischer Lösung Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert, welches mit zwei BCA-Molekülen einen farbigen Komplex bildet. Mit einem ELISA-Reader kann dann die Absorption bei 540 nm gemessen werden.

Es wurden je 10 µl der Fibroblastenzell-Lysate in eine 96-Well-Platte in Doppelbestimmung aufgetragen. Zum Vergleich wurden BCA-Proteinstandards bekannter Konzentrationen mitpipettiert. Anschließend wurde das Entwicklungsreagenz, bestehend aus 50 Teilen BSA-Lösung und einem Anteil Kupfer-II-Sulfat-Lösung zugegeben, leicht geschüttelt und für 30 min bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Mit Hilfe der Standardkonzentrationen konnte eine Eichgerade erstellt werden, aus welcher der Proteingehalt der jeweiligen Lysate abgelesen wurde.

3.3.3 Vorbereitung der Proben

30 - 50 µg isoliertes Gesamtprotein wurden bei Verwendung von 2x Laemmli-Probenpuffer (je 20 µl) mit H_2O auf ein Volumen von maximal 20 µl eingestellt, bei Verwendung von 6x Laemmli-Probenpuffer (je 6,7 µl) auf ein Volumen von 33,3 µl. Die äquivalenten Proteinmengen wurden anschließend bei 95°C für 5 min denaturiert

und nach kurzer Zentrifugation in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der denaturierten Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das XCell II™ Mini-Cell Modul (Novex-Kammer) der Firma Invitrogen BV/Novex verwendet. Hierfür wurden Einmal-Gelkassetten benutzt, in die ein für den Auftrennungsbereich geeignetes SDS-Polyacrylamid-Gel (6% - 15%) mit einem pH-Wert von 8,8 gegossen wurde. Das Trenngel wurde mit einem 5%igen Sammelgel mit einem pH-Wert von 6,8 überschichtet und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und die restliche Sammelgel-Lösung mit Aqua bidest. abgespült. Die fertigen Gele wurden in die Novex-Kammer eingesetzt und diese anschließend mit Laufpuffer (1x) befüllt.

In die Geltaschen gefüllte Proben ließ man bei 120 V (17,5 mA pro Gel) durch das Sammelgel und anschließend das Trenngel wandern. Die Laufzeit betrug ca. zwei Stunden, bis die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hat. Ein sogenannter „Marker“ wurde stets als Größenstandard für die zu detektierenden Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel mitgeführt.

3.3.5 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)

Der Proteintransfer von den SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte ebenfalls mit dem XCell II™ Mini-Cell Blot-Modul mittels Tank-Blotting-Technik. Hierfür wurde eine Sandwich-Anordnung aus Schwämmen, Whatman-Filterpapieren, dem Polyacrylamid-Gel und der Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) hergestellt. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach dem Aufbrechen aus der Einmal-Gelkassette entnommen, mit einem Skalpell das Sammelgel abgeschnitten und auf die Größe des Whatman-Filterpapiers zurechtgeschnitten. Auf die Kathodenseite des Blot-Moduls wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt. Darauf folgte eine Anordnung aus einer Lage Whatman-Filterpapier, dem Polyacrylamid-Gel, der Membran, einer weiteren Lage Whatman-

Filterpapier und zwei weiteren in Transferpuffer getränkten Schwämmen (Abb. 3-4). Beim Aufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen befanden, da sonst nur ein unvollständiger Transfer zu beobachten gewesen wäre. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 300 V und 220 mA für die Dauer von 1,5 Stunden.

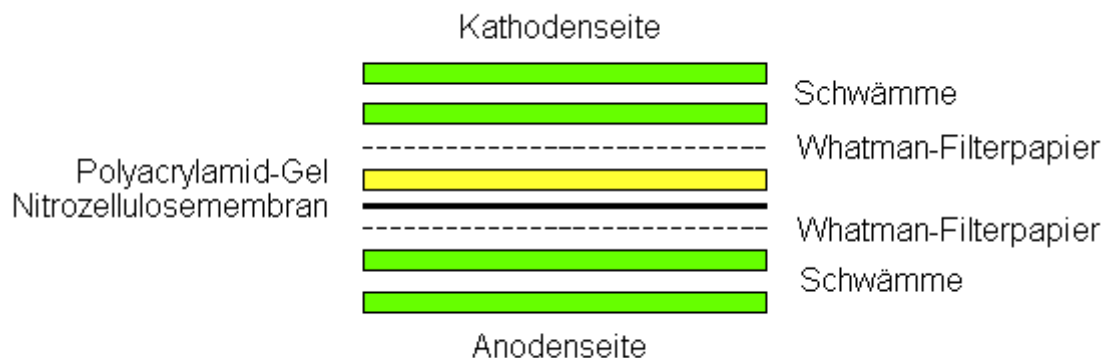


Abb. 3-4: Schema: Sandwichaufbau beim Blotting, bestehend aus zwei Schwämmen, Whatman-Filterpapier, Polyacrylamid-Gel, Nitrozellulosemembran, Whatman-Filterpapier, zwei Schwämmen (von der Kathodenseite zu Anodenseite)

3.3.6 Immundetektion der Proteine

Zur Immundetektion der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C oder alternativ 1 h bei RT in Blockierlösung (5%iger Magermilchlösung oder 5%ige BSA-Lösung in Waschpuffer) geschwenkt. Dies führte zu einer Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran und auf diese Weise zu einer Reduktion unspezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Nachdem die Membran kurz in Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte eine mindestens einstündige Inkubation bei RT unter leichtem Schütteln mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper. Die Membran wurde daraufhin für 6 x 10 min in Waschpuffer kräftig geschüttelt. Der gegen den Primärantikörper gerichtete, in Blockierlösung verdünnte Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) wurde dann für weitere 60 min unter leichtem Schütteln bei RT auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Vor der Entwicklung mit dem ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit wurde die Membran für 6 x 10 min in Waschpuffer kräftig

geschüttelt, um eventuell noch anhaftende, nicht gebundene Antikörper restlos zu entfernen. Die noch mit Detektionslösung befeuchtete Membran wurde in Klarsichtfolie verpackt und mit der Proteinseite nach oben in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Im nächsten Schritt wurde bei Rotlicht in der Dunkelkammer ein Hyperfilm ECL™ für 10 Sekunden bis 45 Minuten aufgelegt, um je nach Intensität der Fluoreszenz ein gut belichtetes Bild zu erhalten. Anschließend wurde der Hyperfilm entwickelt.

Tabelle 3-5: Verwendete Antikörper, eingesetzte Verdünnungen, Art des SDS-Trenngels

Antikörper (Firma, Bestellnummer)	Host (Klon), Art der Antikörpers, eingesetzte Verdünnung, Trenngel
Human Smooth Muscle Actin (Dako, M0851)	Maus (1A4), monoklonal 1:100, 12% SDS-Trenngel
Vimentin (USBiological, V2122-05)	Maus (1.BB.828), monoklonal 1:500, 12% SDS-Trenngel
E-Cadherin (Calbiochem, 205601)	Maus (HECD-1), monoklonal 1:500, 6% SDS-Trenngel
TGF-β1 (Acris, DM1047)	Maus (TB21), monoklonal 1:3000, 12% SDS-Trenngel
TGF-β2 (R&D, MAB612)	Maus (8607), monoklonal 1:250, 12% SDS-Trenngel
Zytokeratin 8 (Chemicon International, MAB3414)	Maus (4.1.18), monoklonal 1:1000, 10% SDS-Trenngel
β-Aktin (zur Ladungskontrolle) (Chemicon International, MAB1501)	Maus (C4), monoklonal 1:20000, Trenngel je nach Antikörper

3.3.7 Stripping der Nitrozellulosemembran

Nach erfolgter Immundetektion des Zielproteins auf der Nitrozellulosemembran konnte diese für weitere Antikörperinkubationen verwendet werden. Hierfür wurden durch ein sogenanntes „Stripping“ der Membran die gebundenen Antikörper durch eine 20-minütige Inkubation mit einem speziellen Western Blot Recycling Kit entfernt. Anschließend wurde die Membran zwei Mal 10 Minuten in Waschpuffer geschwenkt.

3.4 Immunozytochemische Färbung

3.4.1 Aussaat der Zellen auf 2-well-chamber-slides

Verwendet wurde ein Objektträger, auf dem durch einen mit Silikon befestigten Aufsatz zwei *wells* erzeugt wurden (Labtek[®] chamber slides). In jedes *well* wurden intestinale Myofibroblasten, suspendiert in Zellkultur-Medium, einpipettiert.

3.4.2 Fixierung der Zellen

Zur immunhistochemischen Analyse wurden Aufsatz und Silikondichtung der chamber-slides entfernt und die Objektträger mit PBS gespült. Anschließend wurden sie für 5 min in eiskaltes Aceton (-20°C) gestellt, um die Zellen zu fixieren. Danach wurde anhaftendes Aceton abgeschüttelt und die Objektträger wurden 5 min in ein TBS-Pufferbad gestellt. Nach diesem Arbeitsschritt konnten die Objektträger für ca. eine Woche bei -20°C ohne Puffer aufbewahrt werden.

3.4.3 Färbeverfahren mit dem Universal-DAKO-APAAP-Kit

Bei der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik wird ein löslicher Immunkomplex verwendet, der aus alkalischer Phosphatase des Kälberdarms und einem gegen diese gerichteten, monoklonalen Antikörper der Maus besteht. Die APAAP-Enzymreaktion wird mit den Chromogenen Fast Red TR-Chromogen und Naphtholsubstrat durchgeführt, die vorhandene Antigene leuchtend rot anfärben (Abb. 3-5).

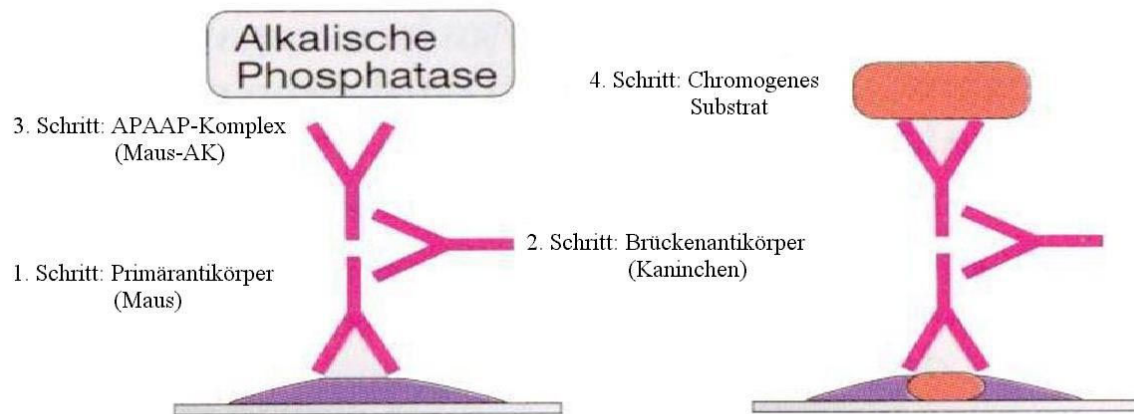


Abb. 3-5: Schematische Darstellung der APAAP-Reaktion (in Anlehnung an: Burmester G.-R. und Pezzutto A., „Taschenatlas der Immunologie“, 1998, S. 77)

Die Objektträger mit den fixierten Myofibroblasten wurden in TBS rehydriert und anschließend zum Blockieren unspezifischer Antigen-Bindungsstellen für eine Stunde in einer 10% FCS/TBS-Lösung inkubiert. Danach wurde überschüssige Feuchtigkeit von den Objektträgern abgeschüttelt und das Test-Areal zur Charakterisierung der Myofibroblasten eine Stunde mit folgendem Primärantikörper und Isotypkontrolle in einer Nasskammer inkubiert, jeweils gelöst in 10% FCS/TBS-Lösung:

Primärantikörper, eingesetzte Konzentration

Mouse Anti-Cytokeratin 8 Monoclonal Antibody
(Chemicon MAB3414, Klon 4.1.18),
10 µg/ml

Isotyp

Maus IgG1
(DAKO X0931)
10 µg/ml

Anschließend wurden die Objektträger dreimal 5 min im TBS-Pufferbad geschwenkt und der Brückenantikörper auf das Testareal aufgetropft. Nach einstündiger Inkubation in einer Nasskammer sind die Objektträger wiederum dreimal 5 min im Pufferbad bewegt worden. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgeschüttelt und die APAAP-Komplex-Lösung auf das Testareal aufgetropft. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Objektträger wieder dreimal 5 Minuten im TBS-Pufferbad geschwenkt. Schließlich wurde noch die Substratlösung zugegeben, 20 bis 40 Minuten inkubiert und letztendlich die Reaktion in TBS abgestoppt. Zum Schluss wurden die Objektträger noch eingedeckelt und 24 h zur Aushärtung des Einschlussmediums nicht bewegt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Immunhistochemische Untersuchungen von Fisteln bei Morbus Crohn-Patienten

Bei über zwei Drittel der Fisteln von Morbus Crohn-Patienten wurde in histologischen Voruntersuchungen ein Übergangsbereich vom Zylinderepithel des Darms bzw. Plattenepithel der Perianalregion zu einer dünnen, Myofibroblasten-ähnlichen Schicht gefunden. Dieser Bereich und seine Entstehung wurden jedoch noch nie genauer untersucht. Aus diesem Grund sollte dieses „Übergangsepithel“ nun immunhistochemisch charakterisiert werden, insbesondere mit dem Blick auf das Vorliegen einer epithelial-mesenchymalen Transformation.

Dazu wurden 14 Fisteln mit solch einer Übergangszone vom „normalen“ Darmepithel zur Fibroblasten-ähnlichen Zellschicht untersucht (Tabelle 3-1). Die Fisteln stammten von 13 Morbus Crohn-Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 34,8 Jahren (17 – 67 Jahre). Sieben Patienten waren weiblich, sechs männlich. Die Fisteln wurden operativ aus dem Dünn-, Dick- oder Mastdarm entfernt und dann in Paraffin gebettet.

4.1.1 Die Zellen der Übergangszone enthalten die epithelialen Intermediärfilamente Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20

Als erstes wurden die Fistelschnitte auf die Expression der epithelialen Intermediärfilamente Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20 untersucht. Wie erwartet zeigte sich im „normalen“ Epithel des Darms eine starke Färbung. Auch in der Übergangszone zu den Fibroblasten-ähnlichen Zellen war eine starke Expression der Zytokeratine zu erkennen. In den durchgeführten Negativkontrollen war keine Färbung detektierbar (Abb. 4-1; Abb. 4-2 und 4-3: jeweils A-E).

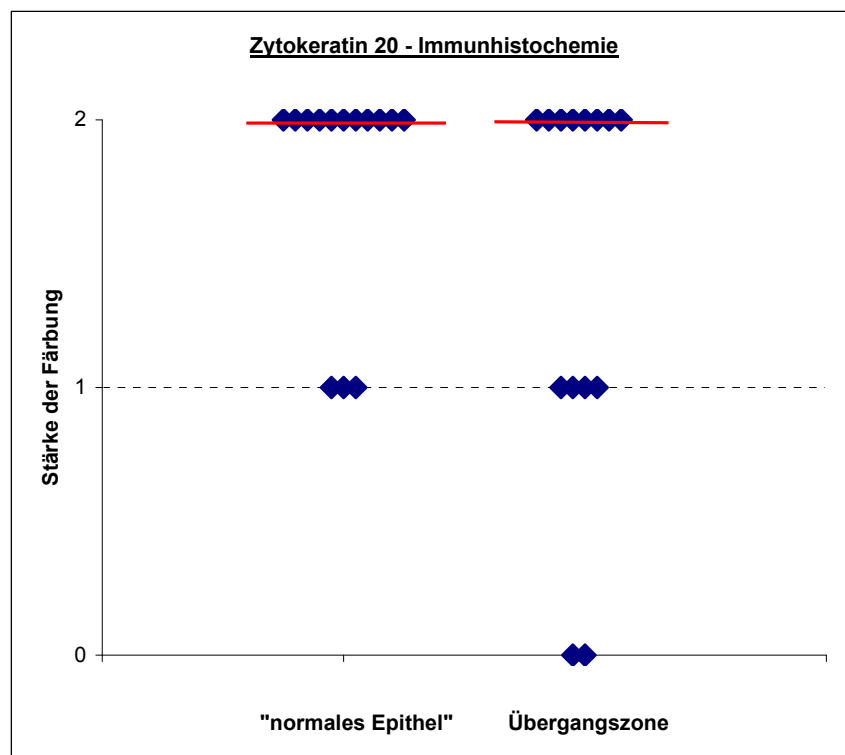
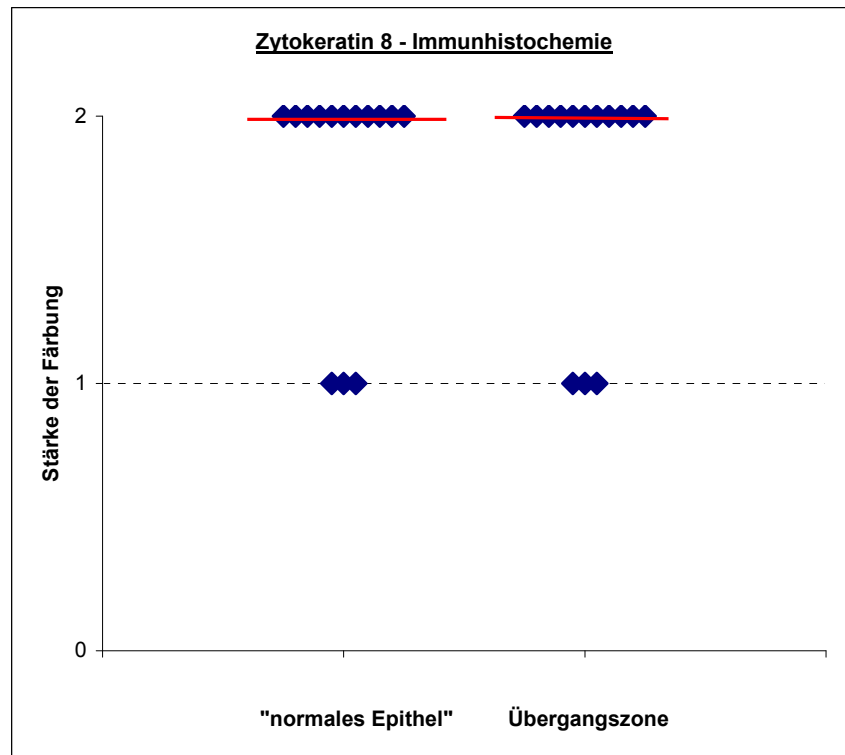


Abb. 4-1: Grafische Auswertung der Zytokeratin 8- und Zytokeratin 20-Immunhistochemie

Bei beiden Immunhistochemien zeigte sich eine starke Färbung der Zytokeratine sowohl im „normalen“ Epithel als auch im Übergangsbereich zu den flachen, mesenchymal imponierenden Zellen.

(Y- Achse: 0: keine Färbung, 1: schwache Färbung, 2: starke Färbung; rote Linie: Median)

Mann-Whitney-U-Test: In beiden Fällen kein signifikanter Unterschied ($p=0,98$ und $p=0,28$)

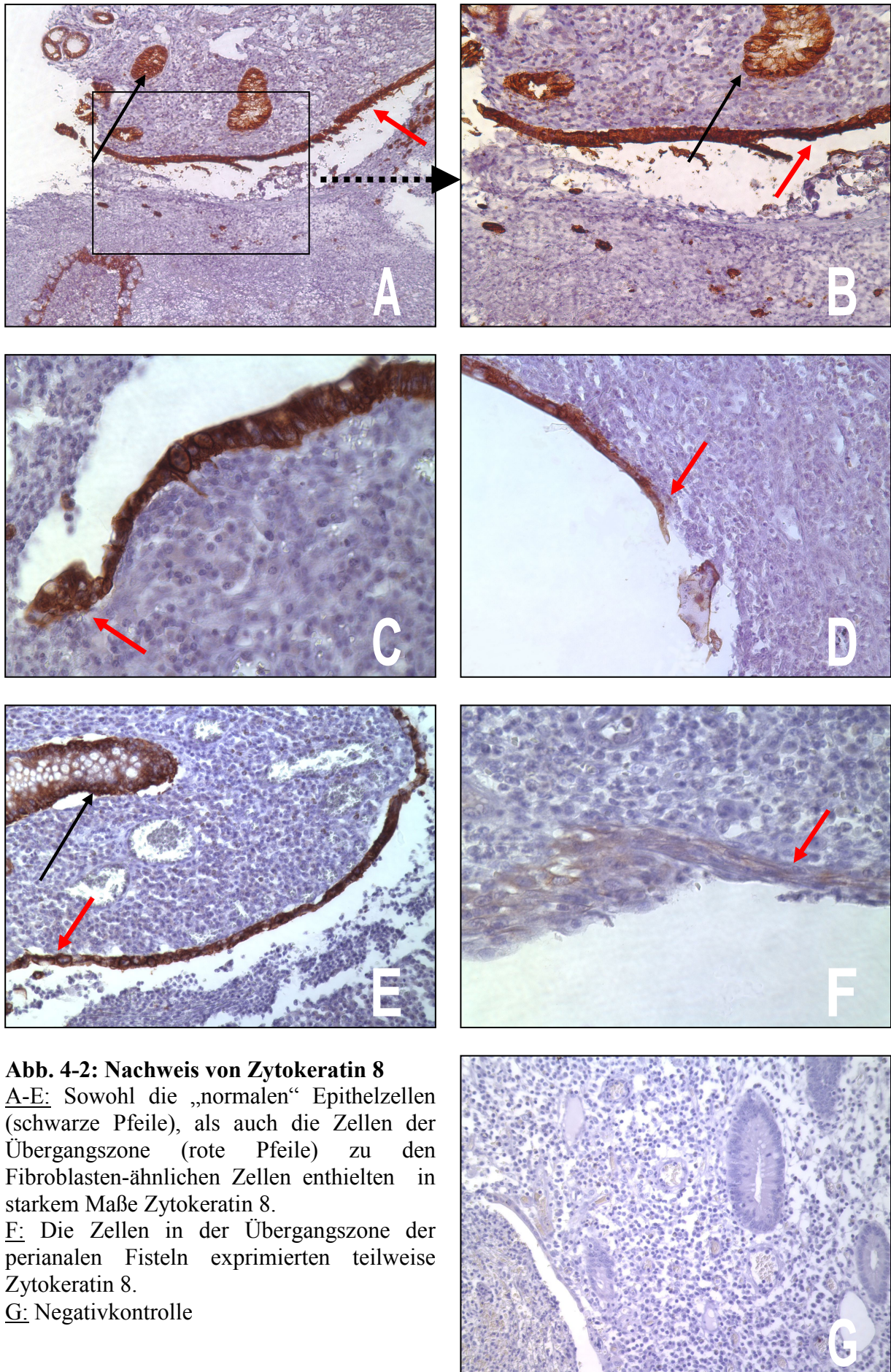


Abb. 4-2: Nachweis von Zytokeratin 8

A-E: Sowohl die „normalen“ Epithelzellen (schwarze Pfeile), als auch die Zellen der Übergangszone (rote Pfeile) zu den Fibroblasten-ähnlichen Zellen enthielten in starkem Maße Zytokeratin 8.

F: Die Zellen in der Übergangszone der perianalen Fisteln exprimierten teilweise Zytokeratin 8.

G: Negativkontrolle

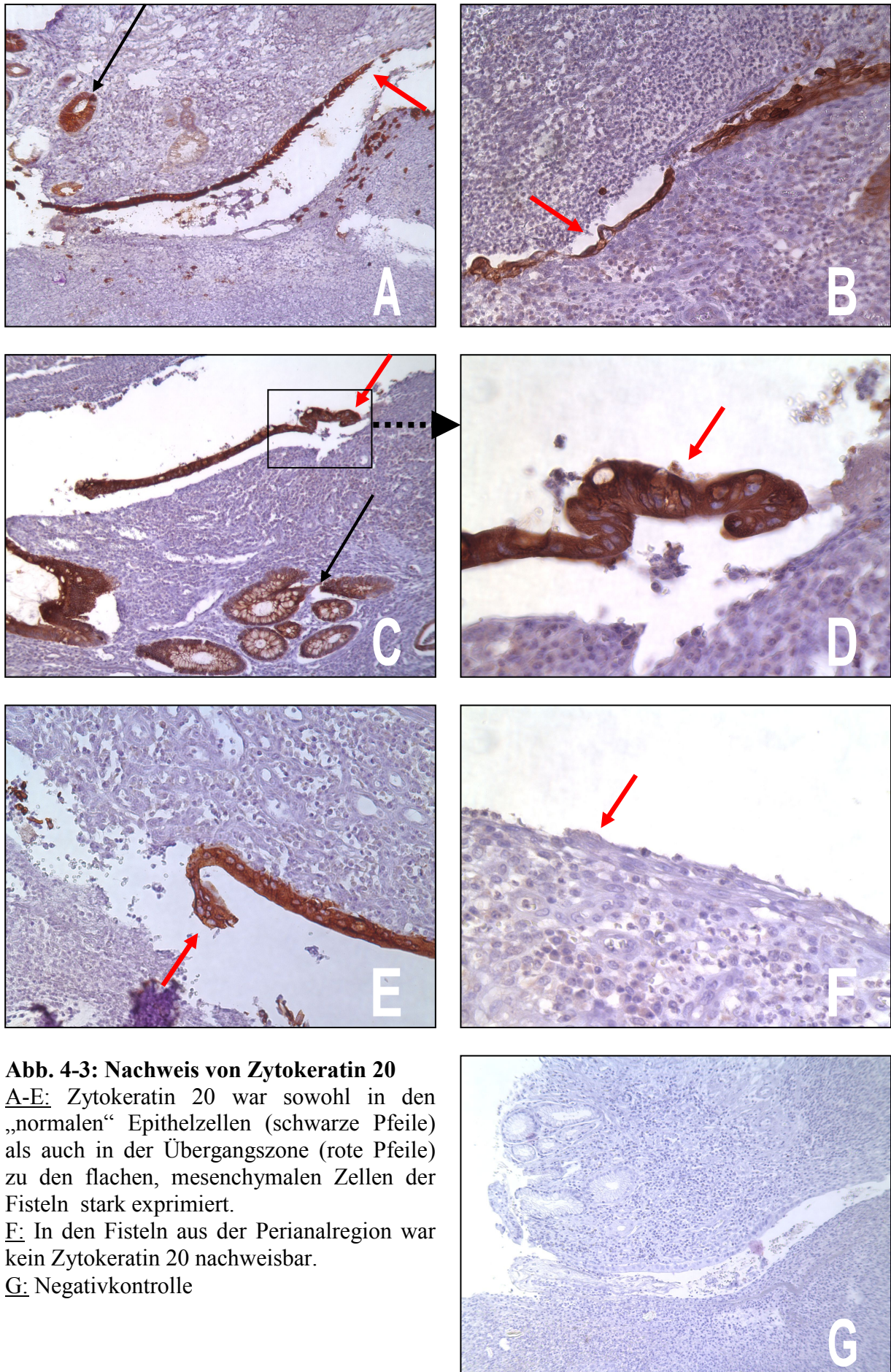


Abb. 4-3: Nachweis von Zytokeratin 20

A-E: Zytokeratin 20 war sowohl in den „normalen“ Epithelzellen (schwarze Pfeile) als auch in der Übergangszone (rote Pfeile) zu den flachen, mesenchymalen Zellen der Fisteln stark exprimiert.

F: In den Fisteln aus der Perianalregion war kein Zytokeratin 20 nachweisbar.

G: Negativkontrolle

4.1.2 In den Zellen der Übergangszone ist keine Expression des mesenchymalen Intermediärfilaments Vimentin detektierbar

In einer weiteren immunhistochemischen Untersuchung wurde die Expression des Intermediärfilaments Vimentin untersucht, welches für mesenchymale Zellen charakteristisch ist. Der verwendete Antikörper lieferte eine starke, auf den ersten Blick teilweise unspezifisch imponierende Färbung. Die „normalen“ Darmepithelien zeigten sich jedoch erwartungsgemäß in allen Schnitten ungefärbt. Lediglich vereinzelte, das Epithel durchdringende Lymphozyten zeigten hier eine Färbung. Bei den flachen Zellen der Übergangszone konnte keine Vimentin-Expression detektiert werden. (Abb. 4-4; Abb. 4-5: A-E)

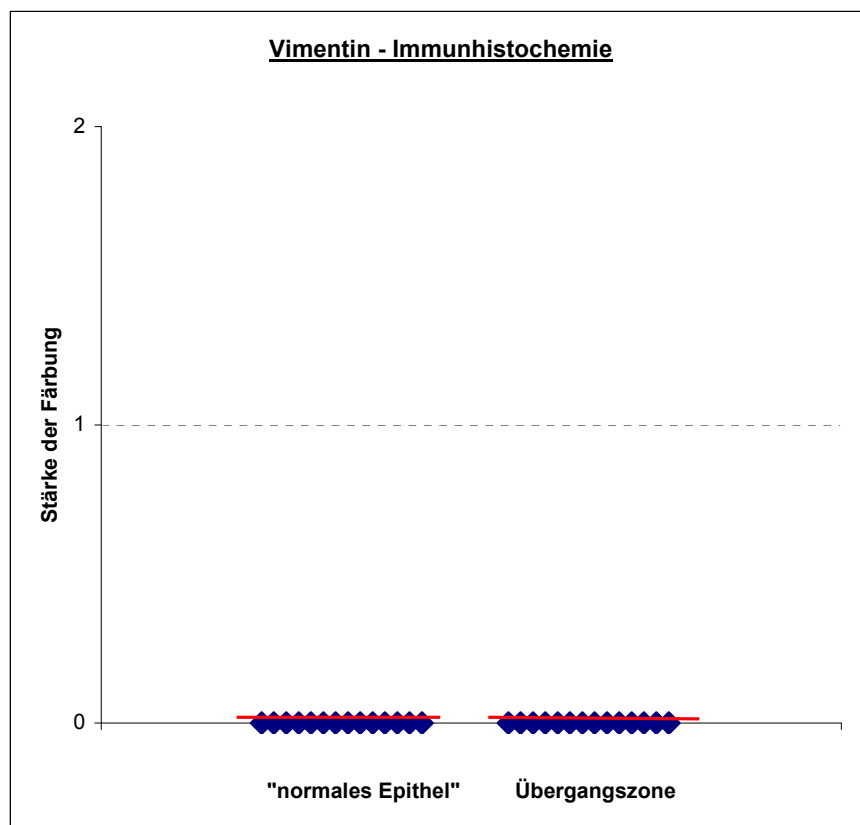


Abb. 4-4: Grafische Auswertung der Vimentin-Immunhistochemie

Sowohl im „normalen“ Epithel als auch im Übergangsbereich zu den Fibroblasten-ähnlichen Zellen konnte kein Vimentin nachgewiesen werden.

(Y- Achse: 0: keine Färbung, 1: schwache Färbung, 2: starke Färbung; rote Linie: Median)

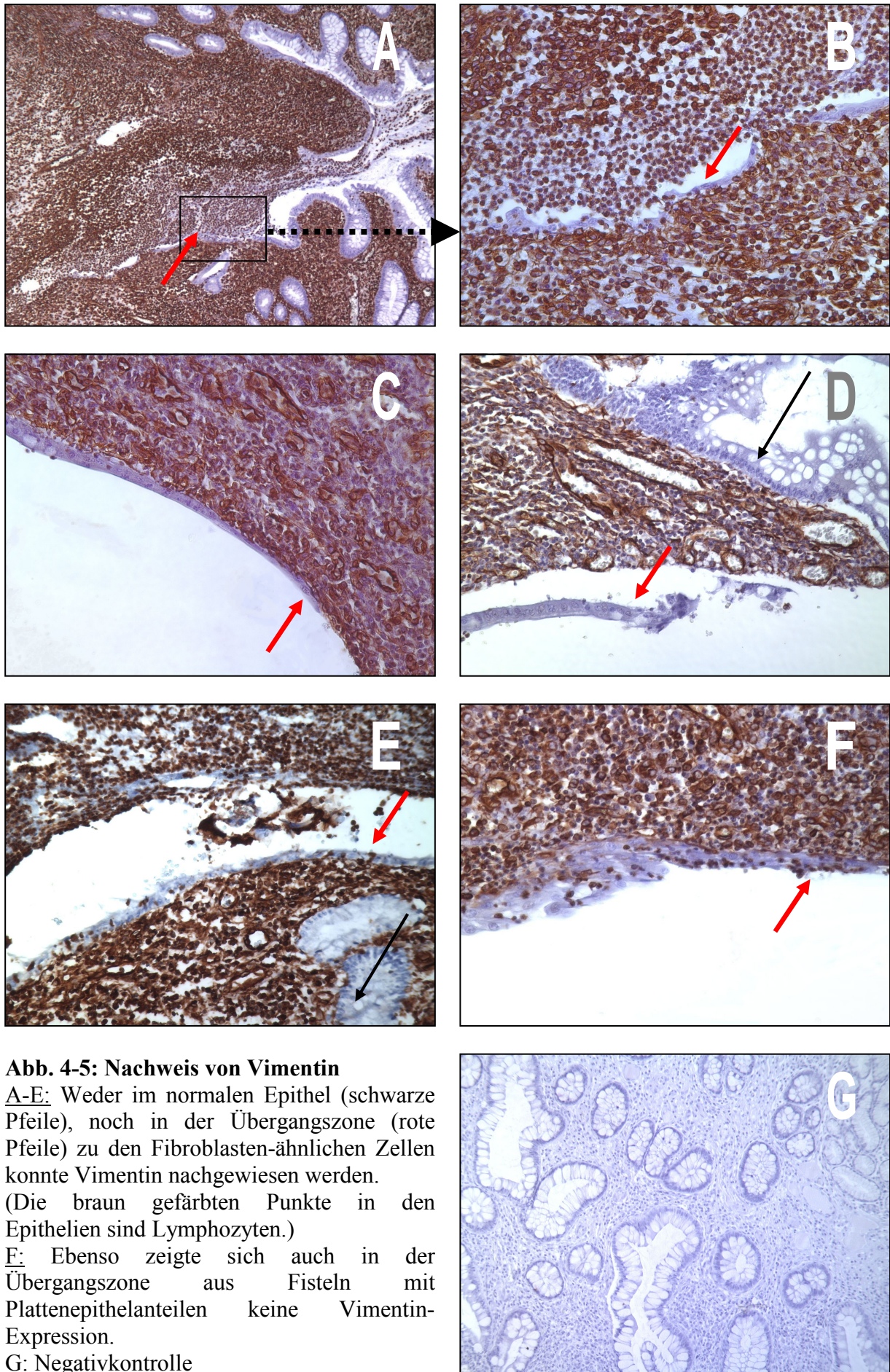


Abb. 4-5: Nachweis von Vimentin

A-E: Weder im normalen Epithel (schwarze Pfeile), noch in der Übergangszone (rote Pfeile) zu den Fibroblasten-ähnlichen Zellen konnte Vimentin nachgewiesen werden. (Die braun gefärbten Punkte in den Epithelien sind Lymphozyten.)

F: Ebenso zeigte sich auch in der Übergangszone aus Fisteln mit Plattenepithelanteilen keine Vimentin-Expression.

G: Negativkontrolle

4.1.3 Im Übergangsbereich nimmt die Expression von E-Cadherin und β -Catenin ab und ist meist nur noch fragmentiert vorhanden

Ein Rückgang der Expression von E-Cadherin ist ein definierendes Charakteristikum einer EMT. Ebenso ist der Rückgang der β -Catenin-Expression und eine Translokation desselben in den Nucleus ein häufig verwendeter und aussagekräftiger molekularer Marker für das Vorliegen einer EMT. [69,79] Aus diesem Grund wurden in den Fistelschnitten auch diese Proteine untersucht.

Im „normalen“ Darmepithel und bis in die Anfangsbereiche der Übergangszone konnte zellwandständig eine starke E-Cadherin- und β -Catenin-Expression festgestellt werden. Diese nahm im Verlauf der Übergangszone signifikant ab (Mann-Whitney-U-Test: E-Cadherin $p=0,003$, β -Catenin $p=0,001$) und war an dem Ende, das mit der Fibroblasten-ähnlichen Zellschicht in Verbindung steht, nur noch schwach zu erkennen (Abb. 4-6; Abb. 4-7 und 4-8: jeweils A-E). Außerdem wurde die Färbung in Richtung dieser mesenchymal imponierenden Zellen bei vielen Fisteln deutlich fragmentiert, nämlich beim E-Cadherin in 64,3% der Fälle und beim β -Catenin in 50%. Eine Translokation von β -Catenin in den Kern war nicht beobachtbar.

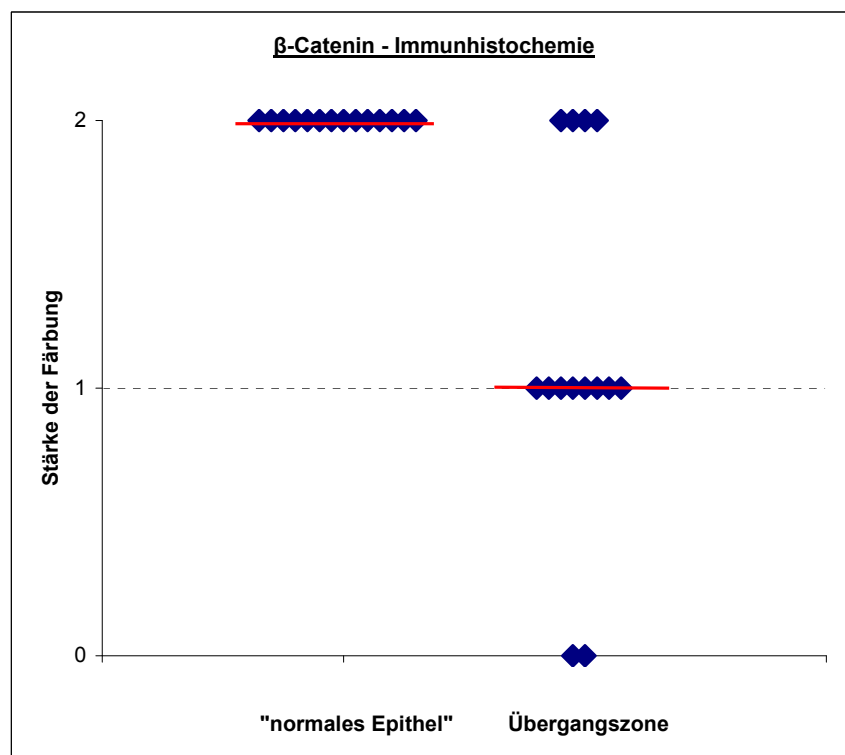
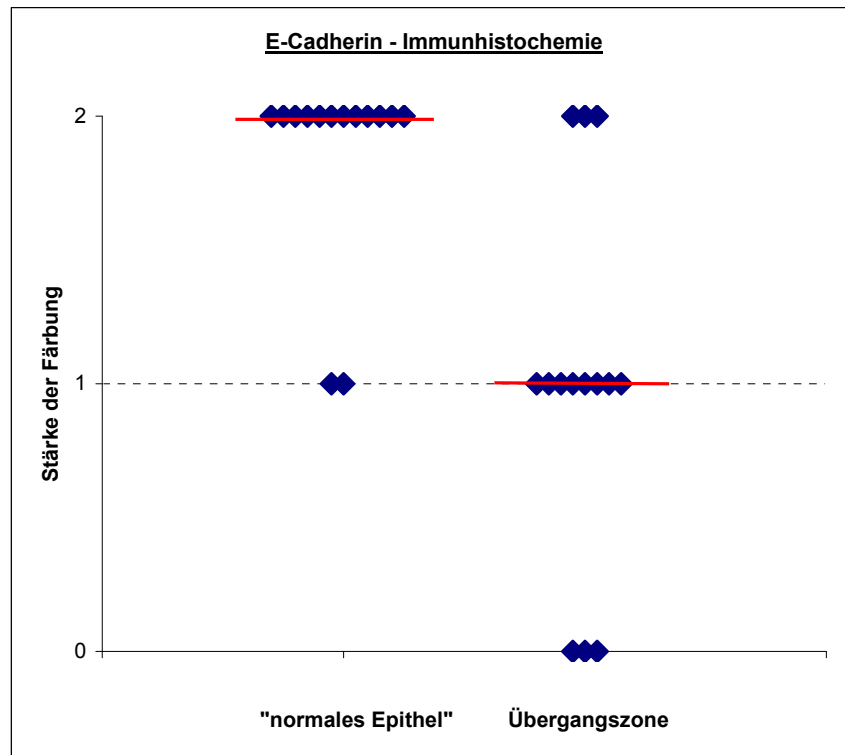


Abb. 4-6: Grafische Auswertung der E-Cadherin- und β -Catenin-Immunhistochemie

Im „normalen“ Epithel wurde eine sehr starke E-Cadherin- und eine sehr starke β -Catenin-Expression gefunden. Im Übergangsbereich nahm die Expression der beiden Proteine deutlich ab und war meist nur noch schwach und fragmentiert detektierbar.

(Y- Achse: 0: keine Färbung, 1: schwache Färbung, 2: starke Färbung; rote Linie: Median)

Mann-Whitney-U-Test: Beim E-Cadherin lag ein signifikanter Unterschied vor ($p=0,003$), beim β -Catenin ebenfalls ($p=0,001$)

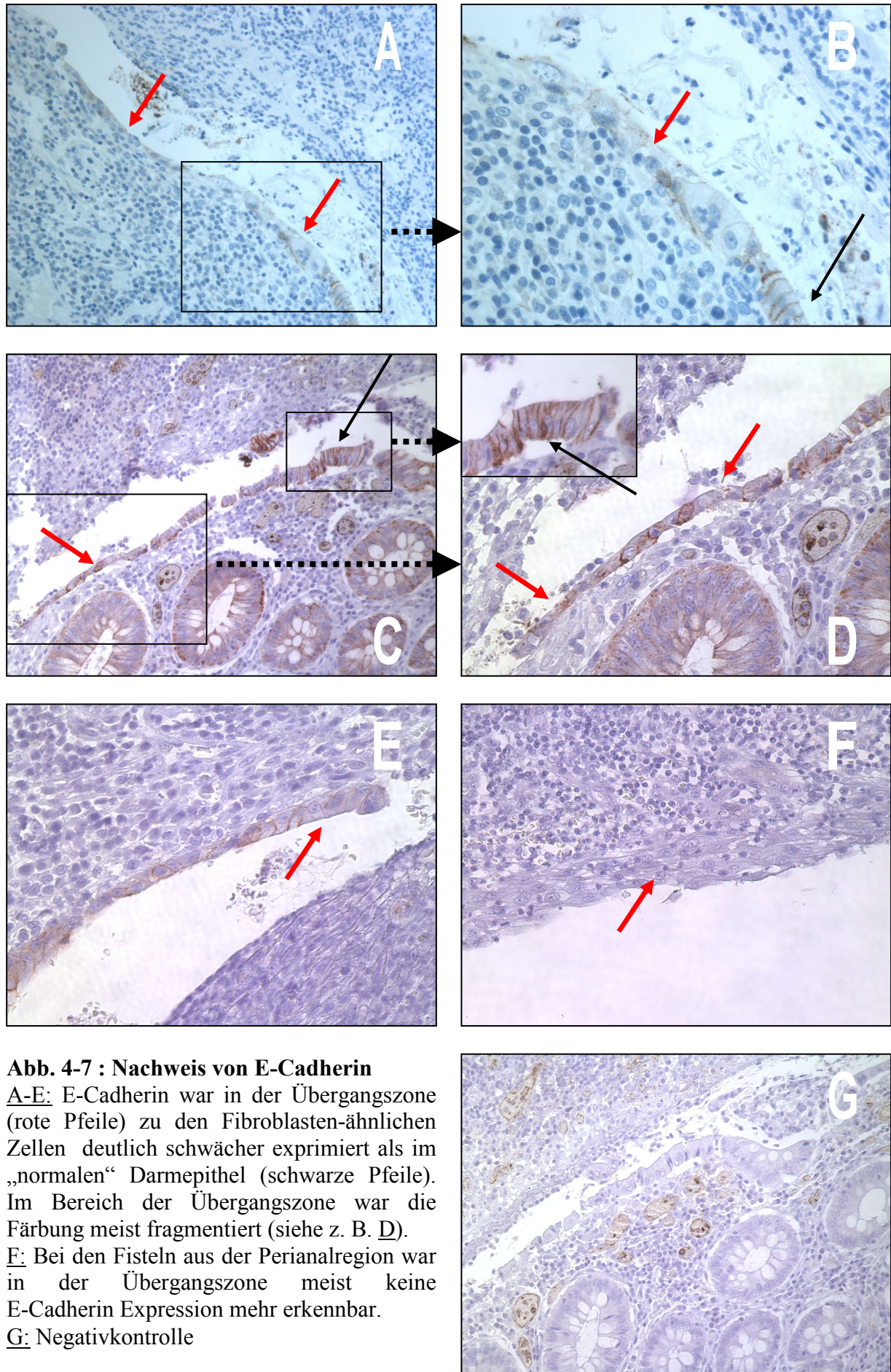


Abb. 4-7 : Nachweis von E-Cadherin

A-E: E-Cadherin war in der Übergangszone (rote Pfeile) zu den Fibroblasten-ähnlichen Zellen deutlich schwächer exprimiert als im „normalen“ Darmepithel (schwarze Pfeile). Im Bereich der Übergangszone war die Färbung meist fragmentiert (siehe z. B. D).

F: Bei den Fisteln aus der Perianalregion war in der Übergangszone meist keine E-Cadherin Expression mehr erkennbar.

G: Negativkontrolle

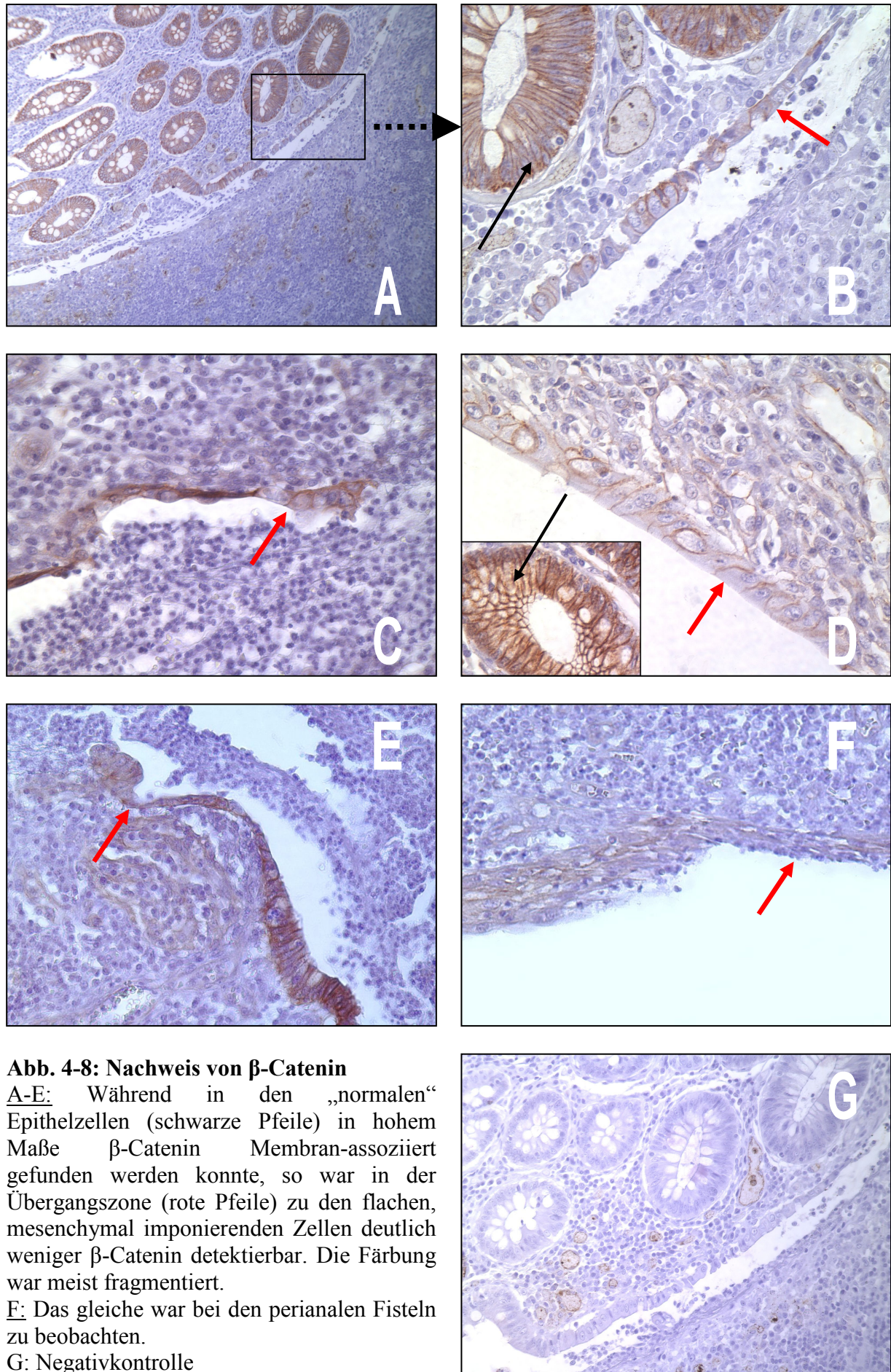


Abb. 4-8: Nachweis von β -Catenin

A-E: Während in den „normalen“ Epithelzellen (schwarze Pfeile) in hohem Maße β -Catenin Membran-assoziiert gefunden werden konnte, so war in der Übergangszone (rote Pfeile) zu den flachen, mesenchymal imponierenden Zellen deutlich weniger β -Catenin detektierbar. Die Färbung war meist fragmentiert.

F: Das gleiche war bei den perianalen Fisteln zu beobachten.

G: Negativkontrolle

4.1.4 Im Übergangsbereich ist eine sehr starke Integrin $\beta 6$ -Expression zu finden

Prof. Bates et al. konnten zeigen, dass die Expression von Integrin $\alpha V\beta 6$ in Kolonkarzinom-Zellen mit der Aggressivität der Metastasierung und dem Ausmaß der EMT korreliert. Während der EMT findet eine transkriptionelle Aktivierung der Integrin- $\beta 6$ Untereinheit statt, so dass dieses Protein ein guter Marker für das Vorliegen einer solchen Transformation ist. [90]

Da für Integrin $\beta 6$ bis jetzt kein kommerzieller Antikörper zur Verfügung steht, sind diese Färbungen in Kooperation mit Professor Bates durchgeführt worden.

Es wurden vier Fisteln immunhistochemisch untersucht und bei allen konnte im „normalen“ Epithel keine Färbung detektiert werden. In den Übergangszonen zeigte sich jedoch eine starke Expression des Integrin $\beta 6$, besonders an den Enden, die direkt an die Fibroblasten-ähnliche Zellschicht angrenzten. (Abb. 4-10: A-E) Der Unterschied war signifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,029$).

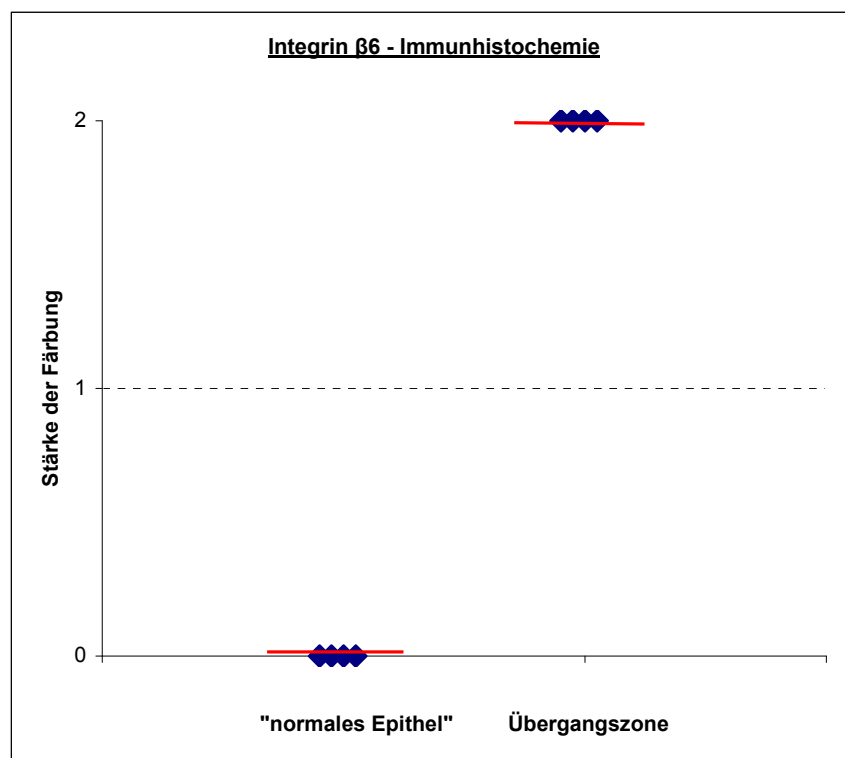


Abb. 4-9: Grafische Auswertung der Integrin $\beta 6$ -Immunhistochemie

Im „normalen“ Epithel konnte kein Integrin $\beta 6$ nachgewiesen werden, während in der Übergangszone eine starke Färbung zu detektieren war.

(Y- Achse: 0: keine Färbung, 1: schwache Färbung, 2: starke Färbung; rote Linie: Median)

Mann-Whitney-U-Test: Der Unterschied war signifikant ($p=0,029$)

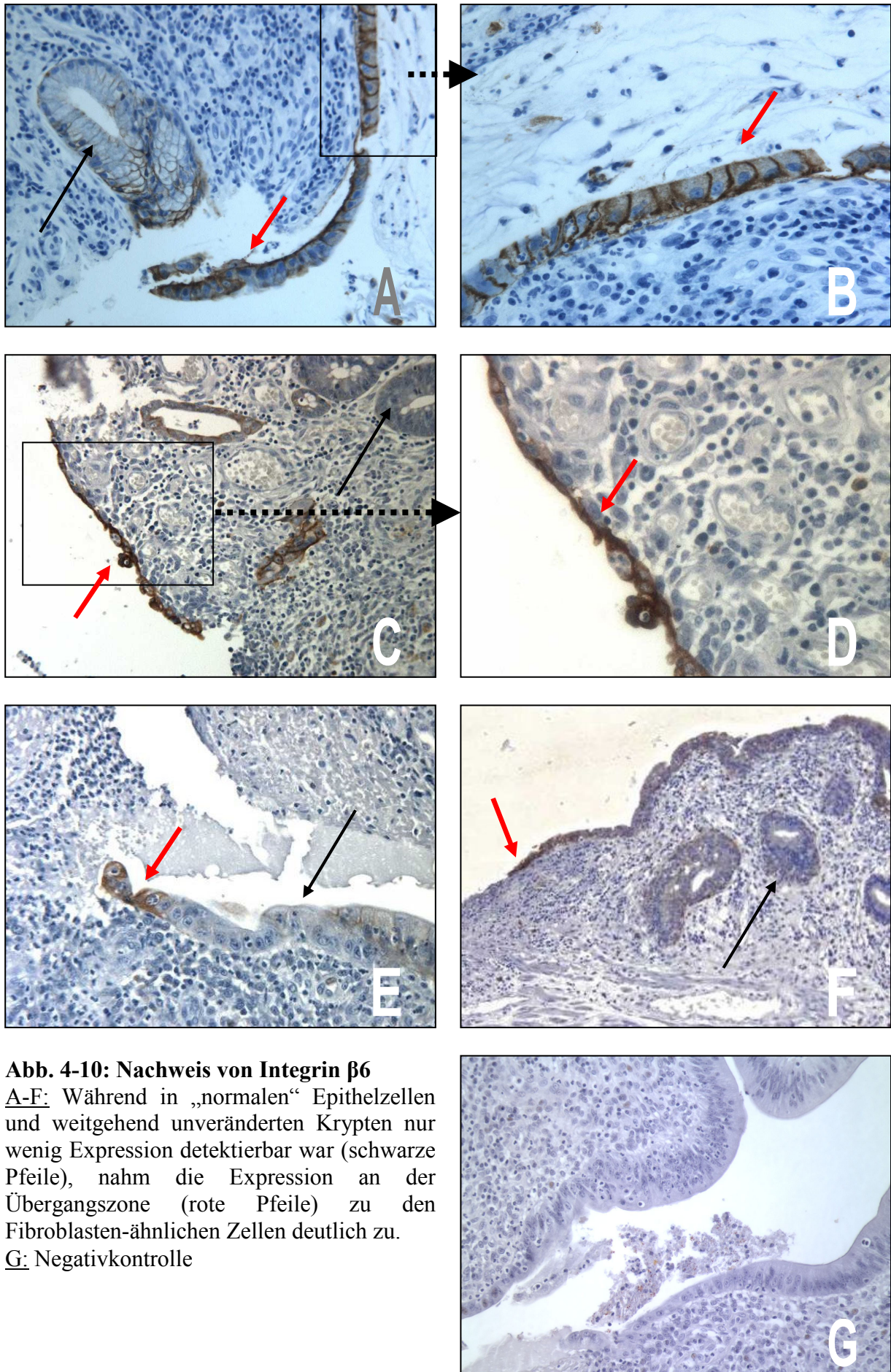


Abb. 4-10: Nachweis von Integrin $\beta 6$

A-F: Während in „normalen“ Epithelzellen und weitgehend unveränderten Krypten nur wenig Expression detektierbar war (schwarze Pfeile), nahm die Expression an der Übergangszone (rote Pfeile) zu den Fibroblasten-ähnlichen Zellen deutlich zu.

G: Negativkontrolle

4.1.5 Im Übergangsbereich zeigt sich eine signifikante TGF- β 1-Expression und eine Zunahme der TGF- β 2-Expression

In vitro- und *in vivo*-Untersuchungen sprechen für eine wichtige Rolle des TGF- β als Induktor der EMT. [91] Zellen, in denen eine EMT durch TGF- β induziert wird, entwickeln meist eine autokrine TGF- β -Signalschleife, die den mesenchymalen Phänotyp stabilisiert. [92] Je nach Gewebe, können alle drei Isoformen des TGF- β involviert sein. Die erhöhte Expression der Proteine ist typisch für eine EMT. [69] An den Fistelschnitten wurden zwei Isoformen des TGF- β untersucht, nämlich TGF- β 1 und TGF- β 2.

Mit dem monoklonalen Antikörper gegen TGF- β 1 zeigte sich im „normalen“ Darmepithel keine Färbung, während in der Übergangszone zu der flachen, mesenchymal imponierenden Zellschicht eine schwache Färbung zu detektieren war (Abb. 4-11; Abb. 4-12: A-E). Der Unterschied war statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,021$).

Die TGF- β 2-Immunhistochemien zeigten eine schwache Expression des Proteins im „normalen“ Epithel des Darms. Im Übergangsbereich von diesem Epithel zu den Fibroblasten-ähnlichen Zellen ließ sich bei der Mehrheit der Fisteln eine starke Expression feststellen (Abb. 4-11; Abb. 4-13: A-E). Statistisch kam es zwar zu einer Verlagerung des Medians von 1 nach 2, also von schwacher zu starker Färbung, allerdings war der Unterschied laut einer Berechnung mit dem Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p=0,447$).

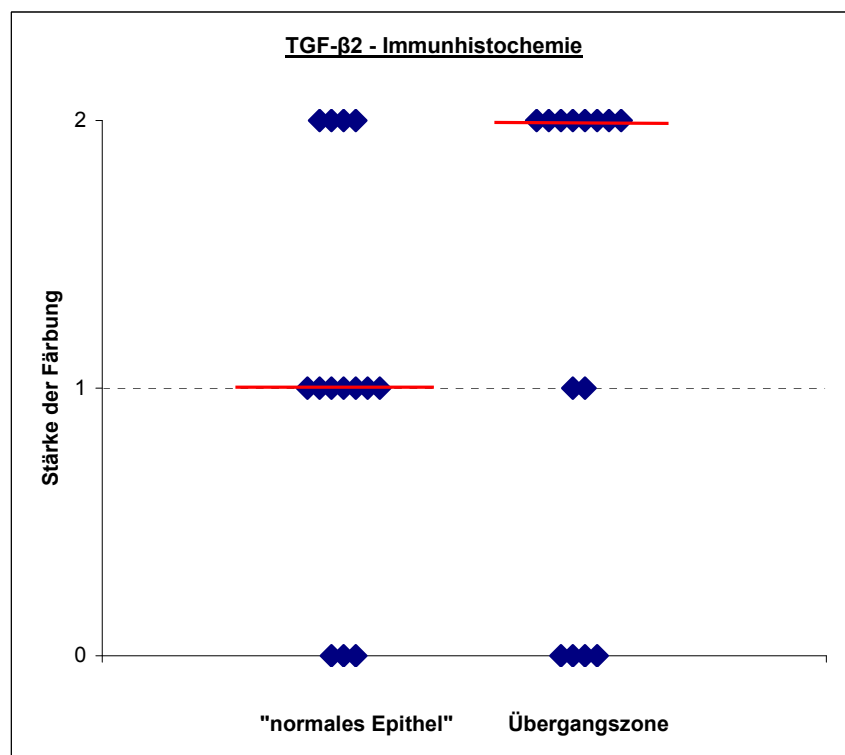
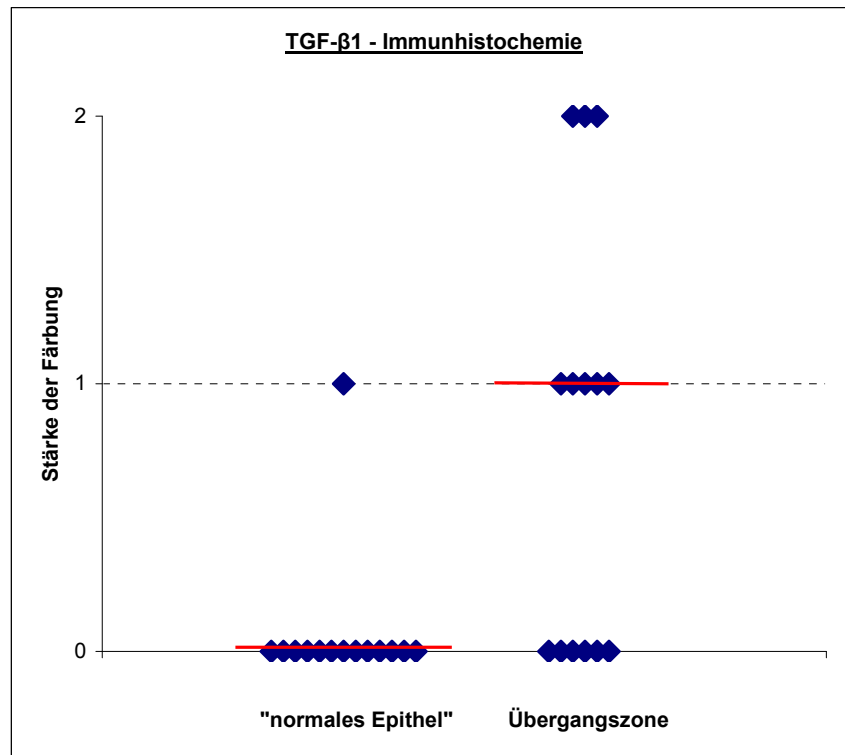


Abb. 4-11: Grafische Auswertung der TGF- β 1 und TGF- β 2-Immunhistochemie

Im „normalen“ Epithel konnte kein TGF- β 1 nachgewiesen werden, eine Färbung des TGF- β 2 war schwach vorhanden. In der Übergangszone zeigte sich im Gegensatz dazu eine schwache TGF- β 1-Expression und eine starke TGF- β 2-Expression.

(Y- Achse: 0: keine Färbung, 1: schwache Färbung, 2: starke Färbung; rote Linie: Median)

Mann-Whitney-U-Test: Beim TGF- β 1 lag ein signifikanter Unterschied vor ($p=0,021$), beim TGF- β 2 nicht ($p=0,447$).

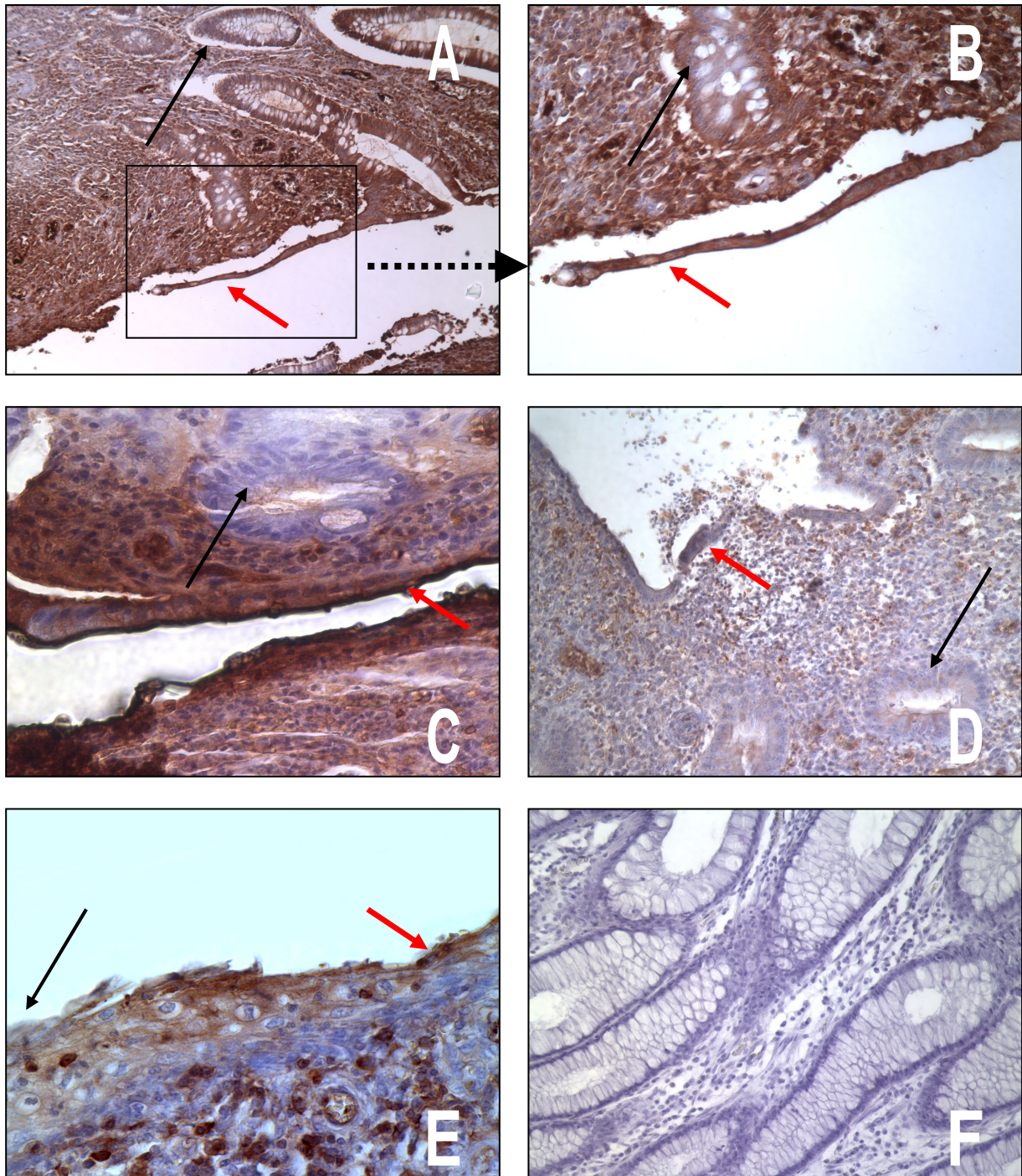


Abb. 4-12: Nachweis von TGF- β 1

A-D: Im „normalen“ Epithel (schwarze Pfeile) konnte meist keine TGF- β 1 Expression detektiert werden, im Übergangsepithel (rote Pfeile) zu den flachen, mesenchymal imponierenden Zellen war dagegen bei den meisten Fisteln eine schwache bis starke Expression zu erkennen.

E: Die gleiche Beobachtung konnte in der Übergangszone der perianalen Fisteln gemacht werden.

F: Negativkontrolle

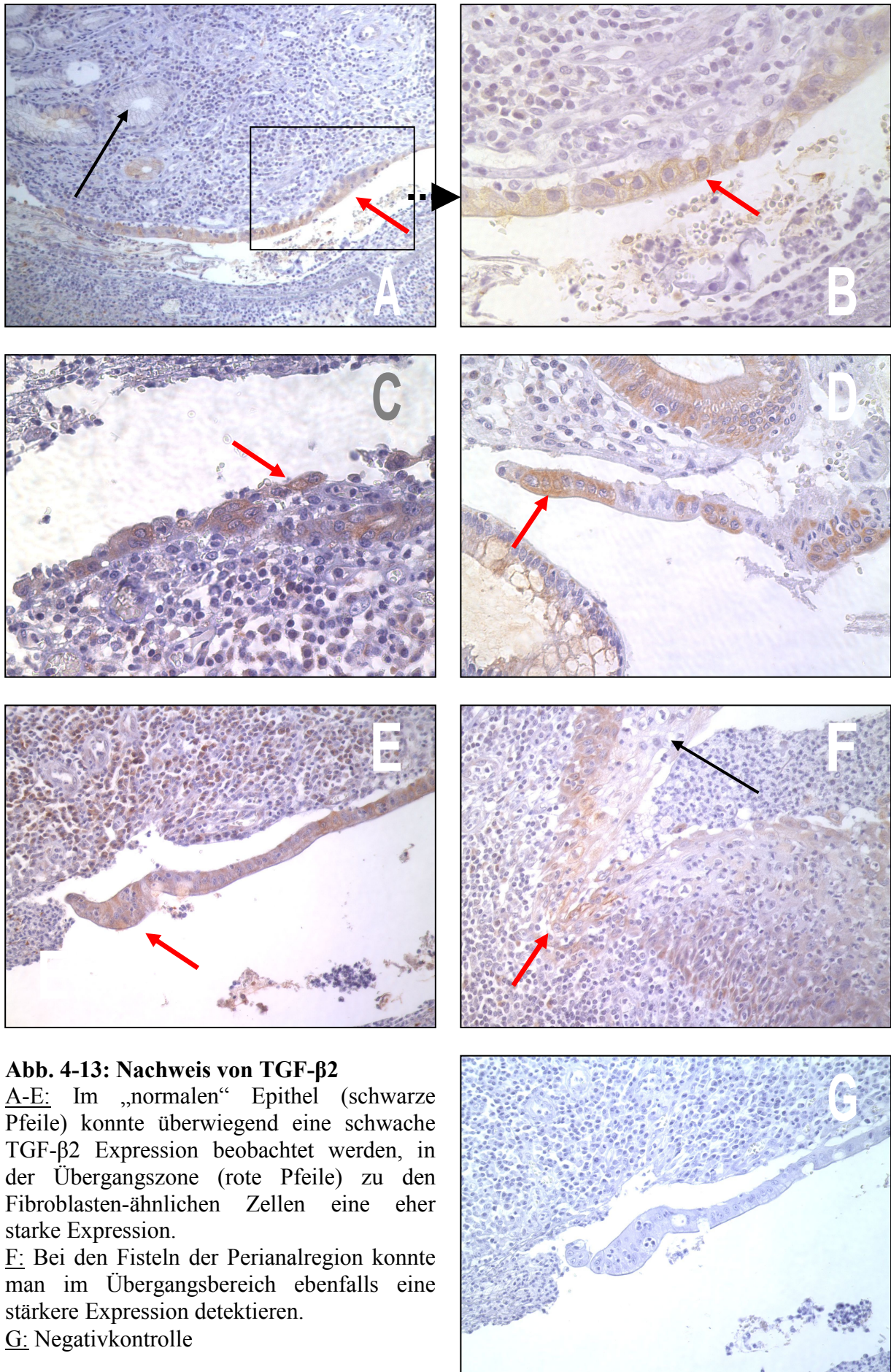


Abb. 4-13: Nachweis von TGF- β 2

A-E: Im „normalen“ Epithel (schwarze Pfeile) konnte überwiegend eine schwache TGF- β 2 Expression beobachtet werden, in der Übergangszone (rote Pfeile) zu den Fibroblasten-ähnlichen Zellen eine eher starke Expression.

F: Bei den Fisteln der Perianalregion konnte man im Übergangsbereich ebenfalls eine stärkere Expression detektieren.

G: Negativkontrolle

4.1.6 Immunhistochemien an Analfisteln zeigen tendenziell die gleichen Ergebnisse wie bei den Darmfisteln

Neben den oben untersuchten 14 Fisteln konnten bei weiteren drei Fisteln von Morbus Crohn-Patienten die gleichen Proteine untersucht werden (Tabelle 3-2). Diese drei stammten jedoch aus dem perianalen Bereich und besaßen somit eine Übergangszone von Plattenepithel zu der flachen, mesenchymal imponierenden Zellschicht. Da Plattenepithel, insbesondere bei den Intermediärfilamenten, eine andere Proteinexpression besitzt, wurden diese Fisteln getrennt ausgewertet. Auf Grund der geringen Anzahl wurden keine statistischen Berechnungen durchgeführt, sondern diese Färbungen sollten nur als kleiner Vergleich dienen.

Die Intermediärfilamente Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20 werden im verhornenden Plattenepithel nicht exprimiert und sind in den Immunhistochemien auch nicht detektiert worden. Die anderen Färbungen stimmten tendenzmäßig mit den Ergebnissen bei den 14 Darmfisteln überein (Abb. 4-14):

- Vimentin war weder im Plattenepithel noch in der Übergangszone anzufärben. (Abb. 4-5: F)
- Beim E-Cadherin war ein Rückgang der Expression von „schwach“ zu „nicht vorhanden“ festzustellen. (Abb. 4-7: F)
- Die Färbung auf β -Catenin zeigte einen Rückgang von „stark“ im Plattenepithel zu „schwach“ in der Übergangszone. In letzterer war in allen drei Fisteln (100%) eine fragmentierte Färbung zu sehen. (Abb. 4-8: F)
- Mit Antikörpern auf Integrin- β 6 konnte nur eine Fistel gefärbt werden. Bei dieser zeigte sich im Plattenepithel keine Färbung und in der Übergangszone eine schwache Färbung.
- Bei den TGF- β 1- und TGF- β 2-Immunhistochemien war die gleiche Verlagerung des Medians wie bei den 14 Darmfisteln zu beobachten (TGF- β 1: „nicht vorhanden“ \rightarrow „schwach“, TGF- β 2: „schwach“ \rightarrow „stark“). (Abb. 4-12: E; Abb. 4-13: F)

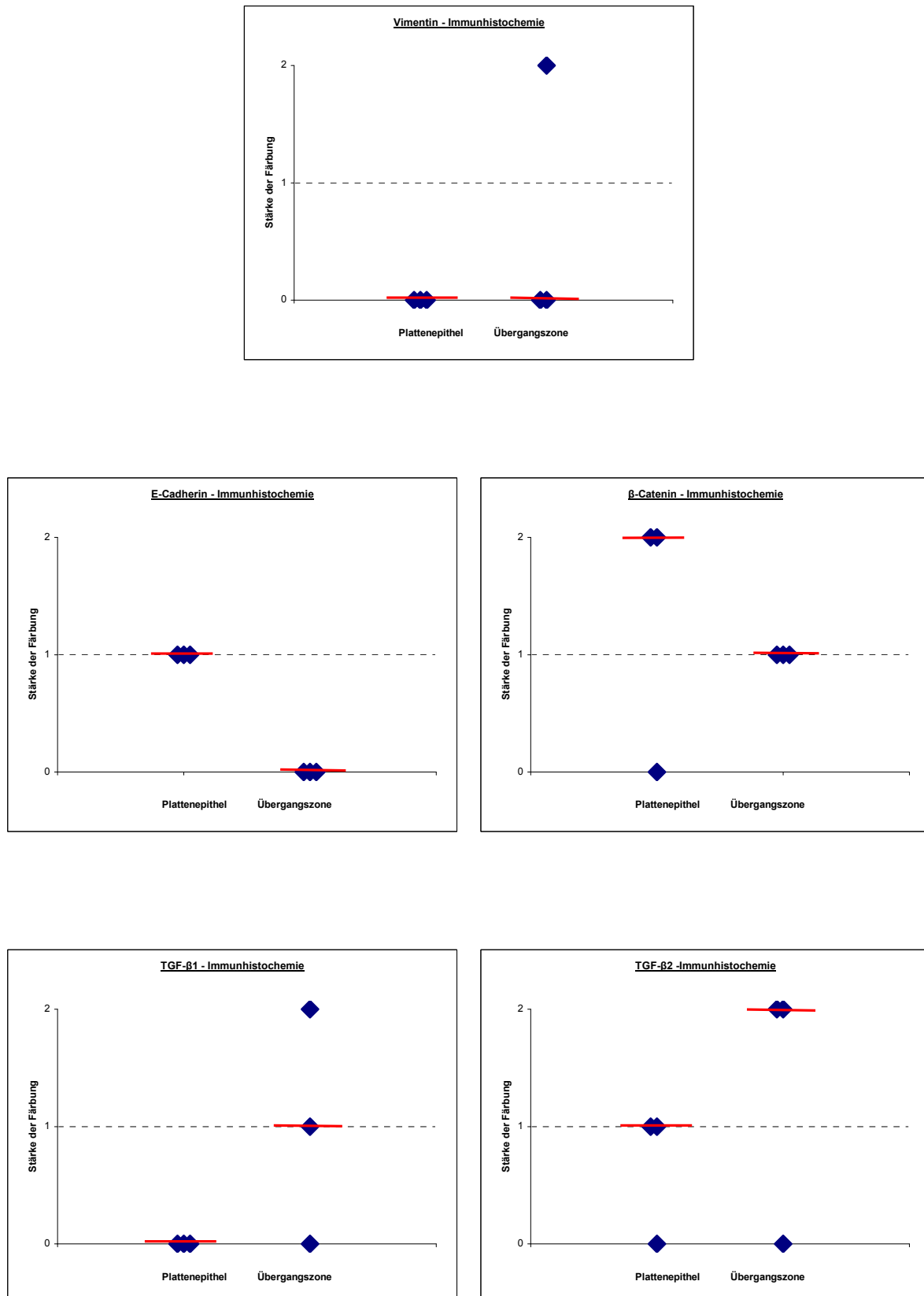


Abb. 4-14: Grafische Auswertung der Immunhistochemien an Fisteln mit Plattenepithelanteilen
Tendenziell ergaben sich bei allen untersuchten Proteinen die gleichen Expressionsunterschiede wie bei den 14 Darmfisteln.
(Y- Achse: 0: keine Färbung, 1: schwache Färbung, 2: starke Färbung; rote Linie: Median)

4.2 Myofibroblasten-Analysen durch Western Blots

Bei der Mehrzahl der Fisteln von Morbus Crohn-Patienten wurden in Voruntersuchungen Myofibroblasten-ähnliche Zellen entdeckt (siehe Kapitel 1.3.4). Um diese genauer charakterisieren zu können, wurden mit Hilfe eines speziellen Protokolls (siehe Kapitel 3.2.1) aus mehreren Fisteln von Morbus Crohn-Patienten solche Zellen isoliert. Ebenfalls isoliert wurden Myofibroblasten aus stenosierte und Myofibroblasten aus rein entzündlich veränderten Darmabschnitten von Morbus Crohn-Patienten (Tabelle 3-4).

Diese Zellen wurden anschließend in Kultur gebracht und ihr Gesamtlysate nach durchgeführter Lyse mit Hilfe von Western Blots untersucht. Das Ziel dieser Analysen bestand darin, die Myofibroblasten-ähnlichen Zellen aus den Fisteln anhand ihrer Proteinexpression zu charakterisieren und eventuell vorhandene Unterschiede zu anderen Myofibroblasten, die aus Stenosen oder reinen Entzündungsgebieten isoliert worden sind, festzustellen.

4.2.1 Die Myofibroblasten-ähnlichen Zellen aus den Fisteln von Morbus Crohn-Patienten enthalten Vimentin und α -Smooth-muscle-Actin

Als erstes wurden zytosolische Gesamtproteinlysate von jeweils drei verschiedenen Fibroblastenkulturen aus den unterschiedlichen Bereichen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte eine Detektion mit verschiedenen Antikörpern (Abb. 4-15):

- Bei dem monoklonalen Antikörper gegen α -SMA zeigten sich bei allen neun Fibroblastenlysaten etwa gleichstarke immunreaktive Banden bei 42 kDa, was der Größe für α -SMA entspricht.
- Bei dem monoklonalen Antikörper gegen Vimentin zeigten sich ebenfalls bei allen neun Fibroblastenlysaten immunreaktive Banden in ungefähr gleicher Stärke. Die Präzipitation lag bei 57 kDa, was der Größe für Vimentin entspricht.

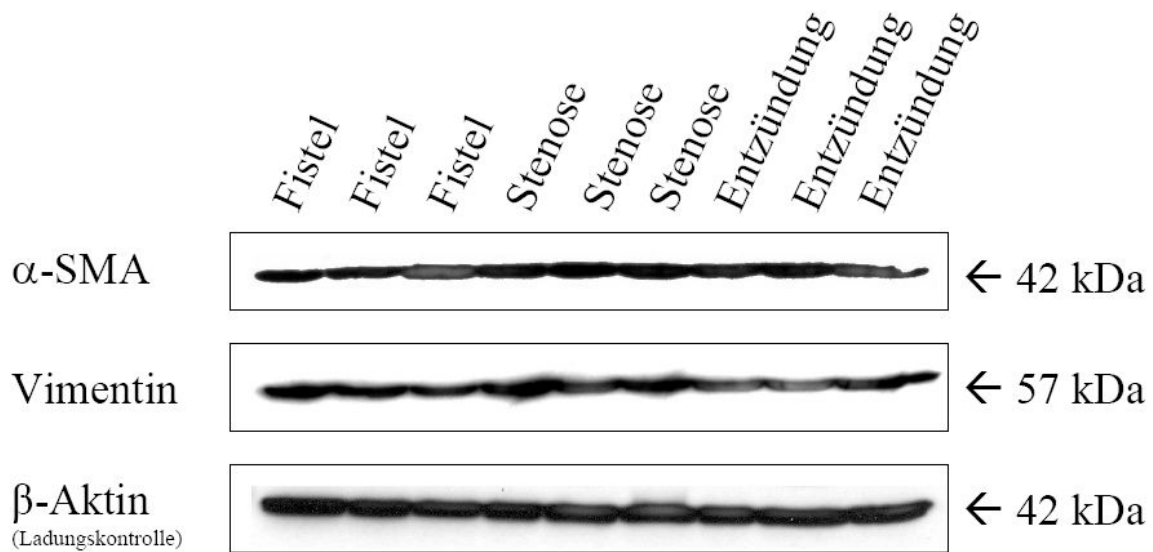


Abb. 4-15: Western Blot-Analysen: Vimentin, α-Smooth-muscle-Actin

Western Blot mit monoklonalen Antikörpern an zytosolischem Gesamtprotein aus Myofibroblasten von Fisteln, Stenosen und Entzündungen. Beladung eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels mit 30 µg Protein pro Spur. Es wurden immunreaktive Banden detektiert. Die 42 kDa-Bande entspricht α-SMA, die 57 kDa-Bande Vimentin und die 42 kDa-Bande β-Aktin (Ladungskontrolle).

4.2.2 Kein E-Cadherin-Nachweis in den Myofibroblastenlysaten

Weiterhin wurde ein Western Blot zur Detektion von E-Cadherin durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Myofibroblastenkulturen aus den unterschiedlichen Bereichen untersucht. Dabei ergab sich nur bei der Positivkontrolle auf Höhe von 135 kDa, was E-Cadherin entspricht, eine starke immunreaktive Bande, bei den Lysaten aus Myofibroblastenkulturen dagegen keine (Abb. 4-16).

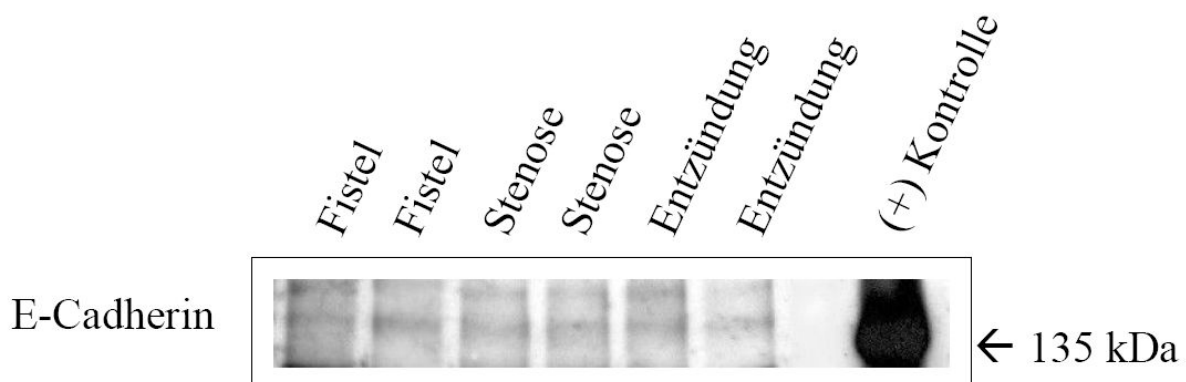


Abb. 4-16: Western Blot-Analysen: E-Cadherin

Western Blot mit monoklonalem Antikörper an zytosolischem Gesamtprotein aus Myofibroblasten von Fisteln, Stenosen und Kontrollen. Beladung eines 6%igen SDS-Polyacrylamidgels mit 50 µg Protein pro Spur. Es wurde eine immunreaktive Bande bei der Positivkontrolle detektiert. Die 135 kDa-Bande entspricht E-Cadherin. Positivkontrolle mit E-Cadherin-haltigem Zelllysate.

4.2.3 Schwache Banden beim TGF- β 1-Nachweis im Lysat von Myofibroblasten-ähnlichen Zellen aus Morbus Crohn-Fisteln

In einem TGF- β 1-Western Blot wurden vier Proben aus Fisteln mit jeweils zwei Stenose- und Entzündungs-Proben verglichen. Bei 25 kDa, charakteristisch für die verschiedenen Isoformen des TGF- β , zeigten sich bei Benutzung eines monoklonalen TGF- β 1-Antikörpers nur bei den vier Fistel-Proben immunreaktive Banden. Zwei der Banden waren stärker ausgeprägt, die Positivkontrolle mit rekombinantem Protein eindeutig detektierbar (Abb. 4-17).

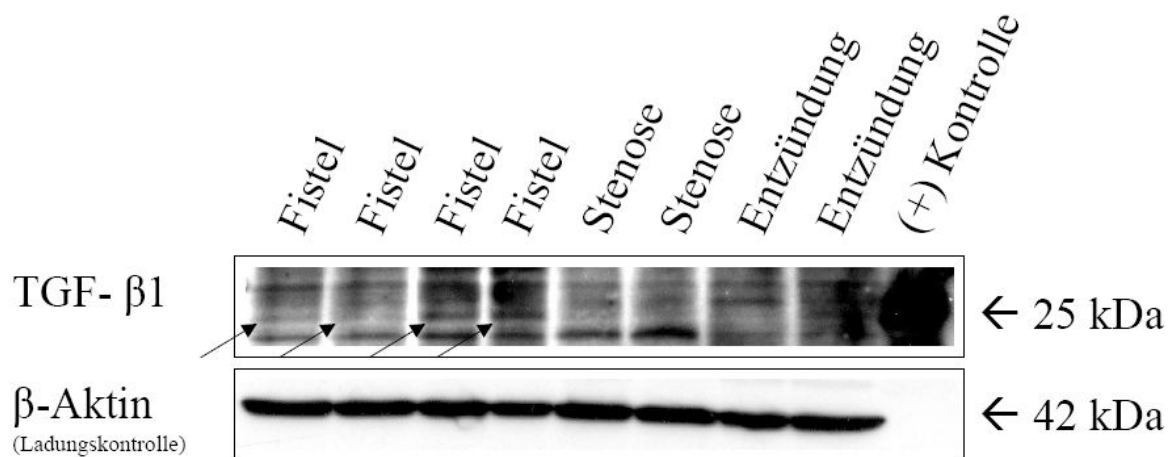


Abb. 4-17: Western Blot-Analysen: TGF- β 1

Western Blot mit monoklonalen Antikörpern an zytosolischem Gesamtprotein aus Myofibroblasten von Fisteln, Stenosen und Entzündungen. Beladung eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels mit 50 μ g Protein pro Spur. Es wurden immunreaktive Banden detektiert. Die 25 kDa-Bande entspricht TGF- β 1, die 42 kDa-Bande β -Aktin (Ladungskontrolle). Positivkontrolle mit 150 ng rekombinantem TGF- β 1.

4.2.4 Menge an TGF- β 2 in den Myofibroblastenlysaten liegt unter der Nachweisgrenze

In einem TGF- β 2-Western Blot mit jeweils drei Lysaten aus den unterschiedlichen Bereichen, konnte bei 25 kDa kein Nachweis dieses Proteins erbracht werden (Abb. 4-18). Um die Empfindlichkeit dieses Antikörpers festzustellen, wurde eine Positivkontrollreihe mitgeführt. Hier zeigten sich erst ab einer Menge von 25 ng des rekombinanten Proteins immunreaktive Banden.

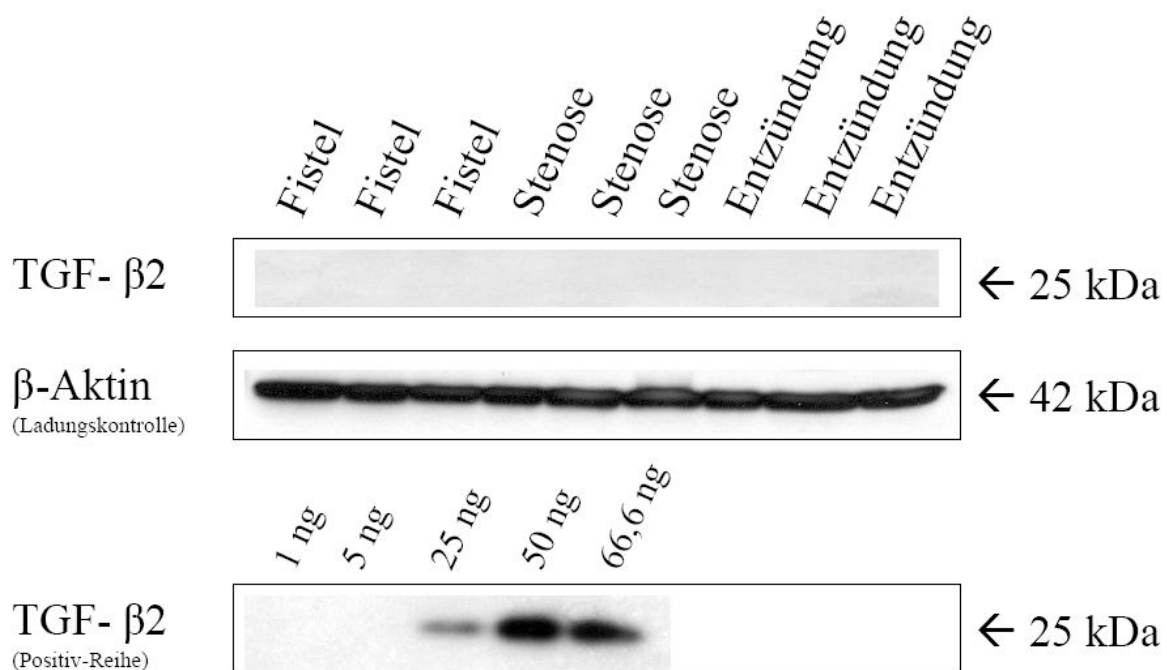


Abb. 4-18: Western Blot-Analysen: TGF- β 2

Western Blot mit monoklonalen Antikörpern an zytosolischem Gesamtprotein aus Myofibroblasten von Fisteln, Stenosen und Entzündungen. Beladung eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels mit 50 μ g Protein pro Spur. Es wurden nur in der Positivkontrollreihe und in der β -Aktin-Ladungskontrolle immunreaktive Banden detektiert. Die 25 kDa-Bande entspricht TGF- β 2, die 42 kDa-Bande β -Aktin (Ladungskontrolle). Positivkontrollreihe mit 1 ng, 5 ng, 25 ng, 50 ng und 66,6 ng rekombinanten TGF- β 2.

4.2.5 Zytokeratin 8 in Myofibroblasten aus Morbus Crohn-Fisteln nachweisbar

Um Hinweise auf eine epitheliale Genese der Myofibroblasten zu bekommen, wurde noch ein Western Blot mit dem Ziel Zytokeratin 8 nachzuweisen durchgeführt. Hier konnten bei drei der fünf eingesetzten Fistel-Proben deutliche Banden detektiert werden (Abb. 4-19). Bei den restlichen Proben ergaben sich nur schwache immunreaktive Banden. Die Lage auf einer Höhe von 52,5 kDa war jeweils für Zytokeratin 8 charakteristisch.

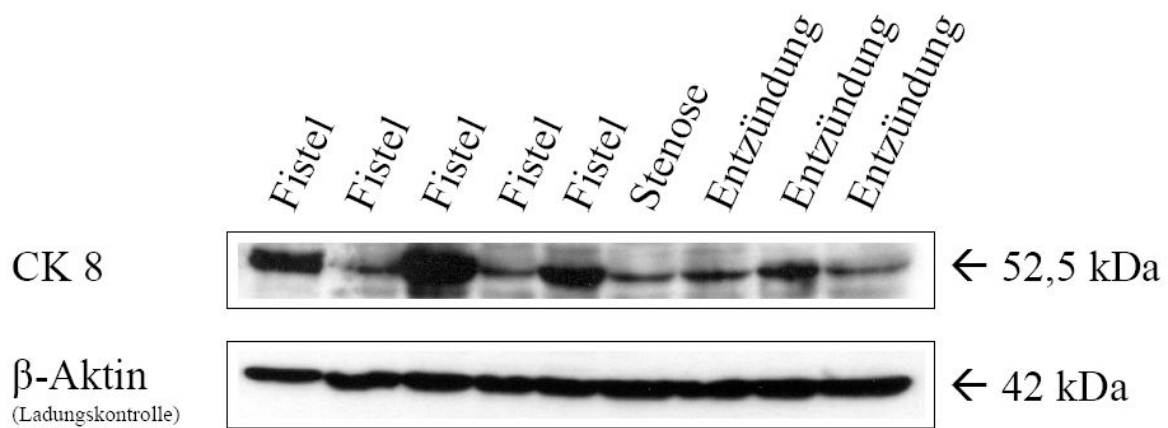


Abb. 4-19: Western Blot-Analysen: Zytokeratin 8

Western Blot mit monoklonalen Antikörpern an zytosolischem Gesamtprotein aus Myofibroblasten von Fisteln, Stenosen und Entzündungen. Beladung eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels mit 50 µg Protein pro Spur. Es wurden immunreaktive Banden detektiert. Die 52,5 kDa-Bande entspricht Zytokeratin 8, die 42 kDa-Bande β-Aktin (Ladungskontrolle).

4.2.6 Zytokeratin 8-Nachweis in Myofibroblasten-ähnlichen Zellen auch durch Immunozytochemie

Der Nachweis von Zytokeratin 8 im Gesamtlisat der Myofibroblasten-ähnlichen Zellen aus Fisteln konnte mittels einer Immunozytochemie validiert werden. Dafür wurden die Zellen auf Labtek® chamber-slides kultiviert und anschließend mit einer APAAP-Methode gefärbt. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Zytokeratin 8 verwendet. Dabei ergab sich in der lichtmikroskopischen Beurteilung bei einem Großteil der Zellen eine deutlich rote Färbung (Abb. 4-20).

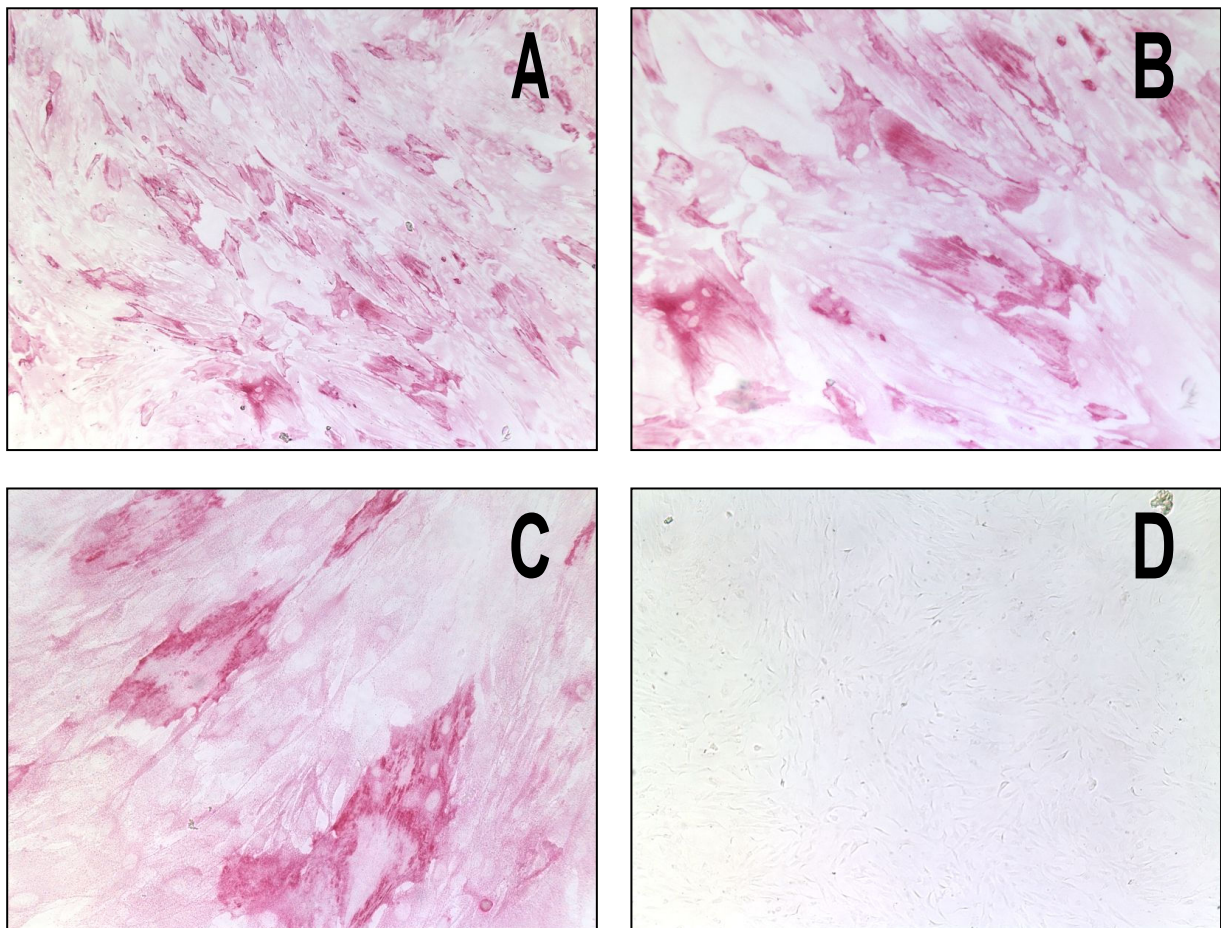


Abb. 4-20: Immunozytochemie mit Antikörpern gegen Zytokeratin 8

A-C: Die Zytokeratin 8-Immunozytochemie zeigte eine deutliche Expression dieses Proteins bei einem Großteil der Myofibroblasten-ähnlichen Zellen, die aus der Fistel eines Morbus Crohn-Patienten isoliert worden sind

D: Negativkontrolle, niedrige Vergrößerung

5 DISKUSSION

Eine EMT, die Umwandlung von Epithelzellen zu Zellen mit einem Myofibroblasten-ähnlichen, mesenchymalen Phänotyp, tritt während der frühen embryonalen Entwicklung, bei fibromatösen Vorgängen und während der Progression von Tumoren in ein metastasierendes Stadium auf. [93,94]

Nun ließ eine vorangegangene Untersuchung von Bataille et al. die Hypothese aufkeimen, dass auch bei der Entstehung von Fisteln bei Patienten mit Morbus Crohn eine EMT mitbeteiligt sein könnte. [51] In dieser Voruntersuchung wurden solche Fisteln morphologisch charakterisiert. Dabei zeigte sich elektronenmikroskopisch, dass in der überwiegenden Anzahl der Fälle die Fisteln von einer dünnen Schicht Myofibroblasten-ähnlicher Zellen ausgekleidet waren. Das „normale“ Darmepithel schien in diese Schicht überzugehen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, weitere Anzeichen oder Widersprüche zur Stützung oder Ablehnung dieser Hypothese zu finden. Dazu wurde zuerst diese Übergangszone auf Marker einer EMT untersucht und dann, in einem folgenden Schritt solche Myofibroblasten-ähnlichen Zellen genauer analysiert.

Zur Verfügung standen 14 Fisteln von Morbus Crohn-Patienten, die eine Übergangszone von „normalem“ Darmepithel hin zu dieser Myofibroblasten-ähnlichen Zellschicht aufwiesen. Diese wurde, jeweils im Vergleich zum „normalen“ Darmepithel, immunhistochemisch untersucht. Es zeigte sich eine Expression von Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20, jedoch noch keine von Vimentin. Die Intensität der Färbung auf E-Cadherin und β -Catenin nahm signifikant ab; Integrin $\beta 6$, TGF- $\beta 1$ und TGF- $\beta 2$ konnten stärker angefärbt werden, bzw. zeigten überhaupt erst eine Expression. Drei Fisteln aus dem Analbereich, also mit Übergang vom Plattenepithel, lieferten Ergebnisse mit vergleichbarer Tendenz.

Durch Western Blot-Analysen wurden anschließend Myofibroblasten-ähnliche Zellen aus den Fisteln genauer untersucht. Diese Zellen, die laut der aufgestellten Hypothese aus Epithelzellen entstanden sein sollen, wurden mit Myofibroblasten aus Stenosen und mit solchen aus entzündeten Darmabschnitten, jeweils von Morbus Crohn-Patienten, verglichen. Alle exprimierten Vimentin und α -SMA, jedoch kein E-Cadherin. TGF- $\beta 1$ konnte in schwachem Ausmaß nur bei den Fistel-Myofibroblasten gefunden werden, TGF- $\beta 2$ war nirgends nachweisbar. Ein großer Unterschied bestand in der Expression von Zytokeratin 8, welches in drei der fünf

Fistel-Myofibroblastenkulturen in stärkerem Ausmaß detektiert werden konnte, sonst aber nur schwach nachweisbar war.

5.1 Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20

In einer ersten immunhistochemischen Untersuchung der Fisteln wurde die Expression von Zytokeratin 8 und Zytokeratin 20 untersucht.

Die Proteine der Zytokeratin-Familie bilden die Intermediärfilamente, welche den Grundbaustein des Zytoskeletts von Epithelzellen darstellen. Solche Keratinfilamente setzen sich jeweils heterodimer aus mindestens einem (sauerem) Typ I- und einem (neutralen/basischen) Typ II-Keratin zusammen. Aktuell sind 20 verschiedene Polypeptide identifiziert, die dieser Gruppe angehören. Ihre Expression korreliert eng mit verschiedenen Epithelien und erlaubt somit eine Klassifikation von Epithelzellen in mehrere Untergruppen. [95,96]

Zytokeratin 20 findet sich reichlich vor allem in Merkel-Zellen, im Urothel und im Kolon, jedoch auch in der intestinalen Mukosa anderer Darmabschnitte. Bevorzugt zeigt sich eine Expression in den differenzierten Enterozyten und Becherzellen der Mikrovilli. [95,97] Zytokeratin 8 ist Bestandteil der meisten sekretorischen und parenchymatösen Zellen in einschichtigen Epithelien. [96]

Bei der EMT finden auf molekularer Ebene gravierende Veränderungen statt. Diese sind Ausdruck der Umwandlung von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Da dies nicht plötzlich, sondern in einem linearen Übergang geschieht, entstehen während der EMT Zellen, die sowohl mesenchymale als auch epitheliale Merkmale aufweisen. [79] Der in vielen Untersuchungen gefundene Rückgang der Zytokeratin-Expression verdeutlicht hier den Abbau letztgenannter. [98-101]

In der Übergangszone der Fisteln wurde eine deutliche Färbung der beiden Zytokeratine detektiert. Dies zeigt eine Abstammung von Epithelzellen an. [102] Etwas unerwartet war allerdings, dass die Intensität der Färbung genauso hoch war wie im „normalen“ Darmepithel. Dies könnte im Widerspruch zum Vorliegen einer EMT stehen oder, was wahrscheinlicher ist, auf die mangelnde Sensitivität der verwendeten Methode bei nur geringen Expressionsunterschieden, v. a. wegen der groben Intervalle bei der Bewertung, zurückzuführen sein.

Die Untersuchungen von Willis und Kollegen, die an kultivierten Alveolarepithelzellen durch TGF- β 1 eine EMT induziert haben, unterstützen dies. [103] Mit Hilfe von Western Blots fanden sie im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine Reduktion der Zytokeratin-Expression auf 29%; bei den weiteren epithelialen Markern war sie deutlich stärker ausgeprägt (AQP5: 10%, ZO-1: 6%). Da diese Messungen zu einem sehr späten Zeitpunkt der EMT durchgeführt worden sind und dies außerdem ein *in vitro*-Experiment mit starker Induktion der EMT war, lässt dies *in vivo* auf eine geringere Abnahme, mit deutlicher Ausprägung erst im Abschlussstadium der Transformation, also evtl. sogar außerhalb der bewerteten Übergangszone, im Bereich der Myofibroblasten-ähnlichen Zellschicht, schließen. Ähnliches zeigte sich auch bei Forino et al. [104]: In einem Zellkulturexperiment waren die Zellen immer noch Zytokeratin-positiv, obwohl der epitheliale Marker E-Cadherin schon nicht mehr nachweisbar war.

Zusammengefasst ist festzustellen, dass mit den Zytokeratin-Immunhistochemien eine epitheliale Abstammung der Zellen in der Übergangszone bewiesen wurde. Eine evtl. vorhandene, nur geringe Reduktion hätte mit der verwendeten Methode und Bewertung kaum nachgewiesen werden können. Außerdem scheint ein Rückgang der Zytokeratine ein später Marker der EMT zu sein, weswegen er im untersuchten Bereich wahrscheinlich noch nicht ausgeprägt detektierbar wäre.

5.2 Vimentin

Zur Detektion mesenchymaler Merkmale wurde die Expression von Vimentin untersucht. Dieses Protein gehört ebenfalls zur Gruppe der Intermediärfilamente. Es besitzt einen homopolymeren Aufbau und ist im Gegensatz zu den Zytokeratinen charakteristisch für viele mesenchymale Zellen. [96,105]

In den durchgeführten Vimentin-Immunhistochemien konnte auf den ersten Blick eine sehr kräftige Färbung in fast allen Bereichen der Schnitte detektiert werden. Da auch eine größere Anzahl von Zellen in den Epithelien markiert wurde, sind Zweifel an der Spezifität des verwendeten Antikörpers berechtigt.

Gegen eine solche Annahme spricht jedoch, dass sich sämtliche „normalen“ Darmepithelien Vimentin-negativ zeigten. Außerdem konnten die in diesem Bereich lokalisierten, gefärbten Zellen als Lymphozyten identifiziert werden. Diese sind spezifisch Vimentin-positiv, so dass auch hier keine unspezifischen Markierungen

vorlagen. Zweifel an der Qualität des Antikörpers scheinen demnach unbegründet zu sein.

In der Übergangszone der Fisteln konnte ebenso wie im „normalen“ Darmepithel kein Vimentin detektiert werden. Dieses Ergebnis war etwas unerwartet, da im Verlauf einer EMT, wie in vielen Untersuchungen bestätigt, eine *de novo* Expression dieses mesenchymalen Markers stattfindet. [98,100,103]

So zeigte sich z. B. an der invasiven Front ösophagealer Adenokarzinome ein Anstieg der Vimentin-Expression. [98] Allerdings ist es fraglich, ob dieses Ergebnis, das wie in mehreren ähnlichen Studien an aggressiven Karzinomen gewonnen wurde, direkt auf die deutlich benigneren Vorgänge bei der Fistelentstehung übertragbar ist. Zum anderen war in den dort bewerteten Zellen kaum mehr zellwandständiges E-Cadherin zu finden, während in den Zellen der Fisteln noch eine schwache Färbung dieses Proteins zu detektieren war.

Dieser Umstand kann den Widerspruch der Ergebnisse gut erklären, wenn man die Experimente von Reichmann et al. miteinbezieht. [106] Diese Arbeitsgruppe fand durch Untersuchungen an Ep-FosER-Zellen, dass bei der dort induzierten EMT die Bildung der mRNA des Vimentins zwar ein frühzeitiges Ereignis darstellt, das Protein selbst jedoch erst nach völligem E-Cadherin-Verlust zu detektieren ist.

Die noch nicht vorhandene Expression von Vimentin in der Übergangszone widerspricht also nicht dem Vorliegen einer EMT. Vielmehr ist dieses Protein in Anlehnung an die Untersuchungen von Reichmann et al. erst spät zu finden. [106]

5.3 E-Cadherin

In einer weiteren Immunhistochemie zeigte sich eine signifikante Reduktion ($p=0,003$) des zellwandständig angefärbten E-Cadherins mit ausgeprägter Fragmentierung der Färbung in der Übergangszone der Fisteln.

Epitheliales (E)-Cadherin ist ein Transmembranprotein, das die Hauptkomponente der Zonulae adhaerentes in polar aufgebauten Epithelien bildet. Seine extrazelluläre Domäne vermittelt homophile, Calcium-abhängige Interaktionen zwischen Epithelzellen, seine intrazelluläre Domäne interagiert über einen Komplex aus Ankerproteinen, wie β -Catenin, α -Catenin und p120 mit dem Aktin-Zytoskelett. [107-109]

E-Cadherin ist für die Integrität von Epithelien funktionell notwendig [110] und wird in allen epithelialen Geweben, nicht jedoch in Mesenchymzellen exprimiert. [111] Neben der Stabilisierung der zellulären Adhäsion besitzt es einen hemmenden Einfluss auf die Migration von Zellen. [112] Antikörper gegen dieses Protein können Zellkontakte unterbrechen und einen mesenchymalen Phänotyp induzieren. [56,113] Bei der Progression der meisten Karzinome wird ein Verlust der E-Cadherin-Expression beobachtet [111], der mit dem Grad der Dedifferenzierung und der Aggressivität des Tumors in Korrelation steht. [114] In vielen Fällen konnte dies mit dem Vorliegen einer EMT in Verbindung gebracht werden. [56,58] E-Cadherin wird teilweise sogar als Invasions-Suppressor-Gen bezeichnet. [111,115]

Auch der in den Fisteln beobachtete, signifikante Rückgang der ausschließlich zellwandständigen E-Cadherin-Expression lässt sich als Zeichen einer EMT interpretieren. Eine Herabregulierung dieses Proteins stellt bei solch einer Transformation den gemeinsamen Endpunkt mehrerer Signalwege dar und gilt als eines der wichtigsten, charakteristischen Schlüsselereignisse. [52,55,79,115]

So konnten z. B. Miettinen und Kollegen an Epithelzellen der Mäusemammary zeigen, dass nach Induktion einer EMT mit TGF- β ein deutlicher Rückgang der E-Cadherin-Expression stattfindet. [116] Cano et al. fanden heraus, dass der Transkriptionsfaktor Snail die EMT ebenfalls über eine Reduktion der E-Cadherin-Expression kontrolliert. [115] Weitere Untersuchungen bestätigen eine Herabregulierung dieses Proteins als aussagekräftigen und viel verwendeten Marker. [112,117]

Die Fragmentierung der Färbung, welche in 64,3% der Fisteln gefunden wurde, zeigt dass der Abbau des E-Cadherins und damit der Zonulae adhaerentes an manchen Stellen schon komplett vollzogen worden ist. In den frühen Phasen der EMT geschieht dies hauptsächlich durch posttranslationale Vorgänge (Ubiquitierung, Endozytose, lysosomale Degradierung), im späteren Verlauf dann über die Transkription. [107]

Der Rückgang der E-Cadherin-Expression, sowie die Fragmentierung der Färbung sprechen also eindeutig für das Vorliegen einer EMT.

5.4 β -Catenin

Anschließend wurde β -Catenin untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant schwächere Färbung dieses Protein in der Übergangszone ($p=0,001$), die in der Hälfte der Fälle fragmentiert war. Wie auch im „normalen“ Darmepithel war die Expression nur zellwandständig zu detektieren.

Diese Ergebnisse können auf die ursprünglich entdeckte Funktion des β -Catenin als intrazelluläres Ankerprotein zurückgeführt werden, durch das die Cadherine indirekt mit dem Aktinzytoskelett verbunden werden. [118] Es bindet dabei an die zytoplasmatische Domäne des E-Cadherins und ist für eine effiziente Zell/Zell-Adhäsion und eine Aufrechterhaltung des epithelialen Phänotyps unentbehrlich. [109,111] Der Rückgang der zellwandständigen Färbung und die Fragmentierung derselben verdeutlichen also, wie oben bereits beim E-Cadherin erläutert, ebenfalls die Auflösung der Zonulae adhaerentes.

Gleiche Beobachtungen wurden auch in mehreren Untersuchungen anderer Forschergruppen gemacht. Allerdings ergab sich bei diesen nicht nur eine Abnahme des zellwandständigen β -Catenins, sondern zudem eine Umverteilung des Proteins in Zytoplasma und Kern. [73,77,119,120]

Diese Translokation ist ein wichtiges Merkmal der EMT. [112,121] Sie findet sich unter anderem an der invasiven Front von kolorektalen Karzinomen [83,119] oder während der Gastrulation beim Seeigel. [122] Sie drückt die Funktion des β -Catenin als Signalmolekül im Wnt-Signalweg aus. Diese Funktion kann nur ungebundenes β -Catenin ausüben, dessen Konzentration im Zytoplasma primär durch einen Abbaukomplex aus der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β , dem Tumorsuppressorprotein APC und dem Protein Axin reguliert wird. [105,123] Auch die Cadherine besitzen in ihrer Funktion als Bindungspartner des β -Catenin großen Einfluss auf die freie Menge dieses Signalmoleküls. [124,125]

Insgesamt reichen schon relativ kleine Mengen an freiem β -Catenin für einen Effekt aus. [126] Nach einer Translokation in den Kern bilden sie einen Genregulatorkomplex mit Mitgliedern der TCF/LEF-Familie und ersetzen dabei das Korepressorprotein Groucho. Dies führt zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen des Wnt-Signalwegs. [105,119]

Dass eine solche Akkumulation von β -Catenin in Kern und Zytosol nicht detektiert werden konnte, liegt mitunter daran, dass der verwendete Antikörper hierfür nicht ausreichend geeignet ist. [127] Zum anderen liefern Erkenntnisse von Eger et al.

eine weitere Erklärung. [128] Diese Gruppe untersuchte die Translokation von β -Catenin bei einer c-Fos-induzierten EMT. Sie konnte nachweisen, dass E-Cadherin der vorherrschende Interaktionspartner des β -Catenins ist und dass mit dessen Reduktion auch die Gesamtmenge an β -Catenin auf 10-30% zurückgeht. Eine größere, ungebundene Menge dieses Proteins zeigte sich erst in den mesenchymalen Zellen, also zu einem Zeitpunkt, als fast kein E-Cadherin mehr detektiert werden konnte. Übertragen auf die Fisteln erklärt dies die β -Catenin-Reduktion und die fehlende nukleäre Translokation auf Grund noch des noch schwach exprimierten E-Cadherins.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Verlust der β -Catenin-Expression ein Anzeichen für das Vorliegen einer EMT ist. Eine evtl. nukleäre Translokation wäre auf Grund des ungeeigneten Antikörpers nicht detektierbar. Diese würde sich wegen der noch vorhandenen schwachen E-Cadherin-Expression außerdem wahrscheinlich nicht mehr in der Übergangszone, sondern außerhalb im Bereich der Myofibroblasten-ähnlichen Zellen zeigen.

5.5 Integrin $\beta 6$

In einem weiteren Schritt wurde die Expression von Integrin $\beta 6$ untersucht. Die Integrine bilden eine Familie heterodimerer Oberflächenrezeptoren, die auf den meisten Zellen exprimiert werden und dort Interaktionen zwischen Zellen untereinander und Zellen mit der extrazellulären Matrix ermöglichen. Sie bestehen aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit, die in nicht kovalenter Weise verbunden sind. Integrine stellen einen Hauptmechanismus dar, über den extrazelluläre Matrix auf intrazelluläre Signalwege Einfluss nehmen kann. [129] Außerdem sind sie mitbeteiligt an vielen Prozessen der Zellen, wie Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung. [130]

Integrin $\alpha V \beta 6$ ist ein Mitglied dieser Familie, das nur bei Epithelzellen zu finden ist; die $\beta 6$ -Untereinheit assoziiert ausschließlich mit der αV -Untereinheit. [129] Es wird in hohem Maße nur während der fetalen Entwicklung exprimiert, in ausdifferenzierten reifen Epithelien jedoch kaum mehr gefunden. Dies stimmt mit dem Ergebnis der Immunhistochemien bei den Fisteln überein, wo im „normalen“ Darmepithel kein Integrin $\beta 6$ gefunden wurde. Inflammation, Karzinogenese und Wundheilung können aber zu einer Re-Expression des Proteins führen. [129,131,132] Insbesondere bei

chronischen Wunden und solchen mit erschwerter Heilung wurde eine Beteiligung nachgewiesen. [132,133] In Studien, bei denen Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle untersucht wurden, zeigte sich in fast allen Proben eine Expression der Integrin $\beta 6$ -Untereinheit, in vielen Fällen besonders stark an den infiltrierend wachsenden Rändern. [131,134] Der genaue Mechanismus, der zu einer Integrin $\alpha V\beta 6$ -Expression führt, ist bis jetzt noch nicht geklärt. [129]

In der Übergangszone der Fisteln zeigte sich eine starke und signifikante ($p=0,029$) Re-Expression des Integrin $\beta 6$. Dies ist ein deutliches Anzeichen für das Vorliegen einer EMT, was durch Untersuchungen von Bates et al. bewiesen werden konnte. [135] Diese Forschergruppe konnte zeigen, dass die Re-Expression von Integrin $\alpha V\beta 6$ in Kolonkarzinom-Zellen mit der Aggressivität der Metastasierung und dem Ausmaß der EMT korreliert. Ein wichtiger Faktor hierfür ist die Fähigkeit von Integrin $\alpha V\beta 6$ das latency-associated peptide (LAP) von TGF- $\beta 1$ [136] und TGF- $\beta 3$ [137] zu binden und somit eine Aktivierung dieser, bei der EMT wichtigen Zytokine herbeizuführen. [138-140] Außerdem induziert es in den EMT-Zellen einen autokrinen TGF- β -Signalkreis zur Aufrechterhaltung der Transformation. [135]

Weitere Beobachtungen zeigen, dass Integrin $\alpha V\beta 6$ die Migration und Invasion von Zellen über die Bindung von Proteinen der extrazellulären Matrix (Fibronektin, Tenascin und Vitronectin) fördert [129] und die vermehrte Sekretion von proteolytischen Enzymen verursacht. [130] Der bei Plattenepithelkarzinomen beobachtbare Wechsel von $\alpha V\beta 5$ auf $\alpha V\beta 6$ schützt die Zellen vor einer Apoptose in Form einer Anoikis. [141]

Die Expression von Integrin $\alpha V\beta 6$ in der Übergangszone der Fisteln ist somit ein deutlich ausgeprägtes Zeichen für das Vorliegen einer EMT.

5.6 TGF- $\beta 1$ und TGF- $\beta 2$

Die Immunhistochemie auf TGF- $\beta 1$ zeigte, dass dieses im „normalen“ Darmepithel nicht exprimiert wird, während in der Übergangszone eine signifikante ($p=0,021$) *de novo* Expression zu detektieren war. Die Stärke der TGF- $\beta 2$ -Färbung erhöhte sich im Übergangsbereich von schwach auf stark, jedoch nicht signifikant ($p=0,447$).

Die Familie der transforming growth factors (TGF)- β besteht beim Menschen aus drei sehr ähnlichen Peptid-Isoformen, nämlich TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ und TGF- $\beta 3$. [140,142,143] Diese pluripotenten Faktoren können selbst im gleichen Zelltyp

vielfältige Vorgänge verursachen. In Epithelzellen können sie sowohl eine Apoptose, wie auch eine EMT induzieren, wobei ein Zusammenhang mit dem Stadium im Zellzyklus vermutet wird. [144] Wegen ihrer wachstumshemmenden Funktion können sie als Tumor-Suppressor bezeichnet werden. [145] Sie spielen zum einen eine wichtige Rolle während der Embryogenese [143], zum anderen sind sie wichtige Modulatoren einer Immunantwort. Sie werden dabei auch von Nicht-Immunzellen produziert. [146] Insbesondere bei Entzündungen und über aktivierte Mesenchymzellen induzieren sie die Synthese extrazellulärer Matrix und fördern die Zellproliferation und –migration. [142,147] *In vitro* konnte TGF- β 1 die Permeabilität von Epithelien erhöhen. [148]

Wie viele andere leistungsfähige Zytokine werden sie in inaktiver Form sezerniert, um eine unkontrollierte Aktivierung ihrer Rezeptoren zu verhindern. Aktiviert werden können sie über verschiedene Mechanismen, unter anderem durch die Aktivität von Proteasen oder durch Integrin α V β 6. [140,148,149]

Die Moleküle der TGF- β -Familie zählen zu den Schlüsselregulatoren und wichtigsten Induktoren der EMT [145], wobei insbesondere TGF- β 1 als der hauptsächliche Faktor identifiziert worden ist. [56,150] Allerdings ergaben Untersuchungen, dass in verschiedenen Organen und teilweise sogar während unterschiedlicher Zeitpunkte der EMT unterschiedliche TGF- β -Isoformen beteiligt sein können. [142,143] Aus diesem Grund wurden bei den Fisteln gleich zwei der Isoformen untersucht.

Beim TGF- β 2 zeigte sich hierbei eine starke Expression in der Übergangszone, was sicherlich für eine Beteiligung dieses Zytokins im Verlauf der Fistelentstehung sprechen kann. Allerdings war dieser Unterschied im Vergleich zum „normalen“ Darmepithel nicht signifikant, so dass der Grund für diese Hochregulation auch in der stärkeren Entzündungsreaktion im Fistelbereich gesehen werden könnte. Dies ist aber wegen der nahezu ausschließlich „epithelbegrenzten“ Lokalisation unwahrscheinlich.

Beim TGF- β 1 wurde in der Übergangszone eine signifikante *de novo* Expression detektiert, was ein deutliches Anzeichen für das Vorliegen einer EMT darstellt. Hierfür spricht zum einen, dass dieses Zytokin durch Integrin α V β 6 aktiviert werden kann, welches in diesem Bereich eine starke Expression aufweist und in Zusammenhang mit dem Vorliegen einer EMT steht. [66,135] Zum anderen wurde die Fähigkeit des TGF- β 1 eine EMT zu induzieren in vielen Experimenten bestätigt. [99,100,103,151,152] Zum Beispiel zeigten Rees et al. mit Hilfe

immunhistochemischer Marker das Vorliegen einer EMT bei ösophagealen Adenokarzinomen und wiesen eine Assoziation mit einer TGF- β 1-Expression an der invasiven Front nach. [98] Oder Compton et al. konnten zeigen, dass TGF- β 1 und TGF- β 2 an Herz-Explantaten einen Verlust epithelialer und die Expression mesenchymaler Merkmale induzieren. [101]

Das detektierte TGF- β 1 und in geringerem Maße auch das TGF- β 2 unterstützen demnach die Hypothese einer EMT bei der Fistelentstehung.

5.7 Untersuchung der vermutlich durch EMT entstandenen Zellen

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Myofibroblasten-ähnliche Zellen aus Fisteln von Morbus Crohn-Patienten isoliert und in Kultur gebracht. Laut Hypothese sind diese Zellen durch eine EMT entstanden. Sie wurden im Vergleich mit Myofibroblasten aus Stenosen und solchen aus Entzündungen mit Hilfe von Western Blots untersucht. Alle Experimente wurden mit Myofibroblasten der mindestens dritten Generation durchgeführt, um eventuelle Fehlergebnisse durch verunreinigte Populationen zu vermeiden. Myofibroblasten-Populationen in diesem Stadium sind annähernd frei von Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen. [153]

Phänotypische Marker:

Zuerst wurde die Expression epithelialer und mesenchymaler Marker untersucht. Vimentin und α -SMA übernahmen die Aufgabe der zuletzt genannten. α -SMA ist genauso wie Vimentin ein Bestandteil des Zytoskeletts vieler mesenchymaler Zellen. Unter den verschiedenen phänotypischen Markern für Myofibroblasten stellt es den zuverlässigsten dar [154], denn diese Zellen zeichnen sich durch α -SMA-positive Stressfasern aus, die parallel zu ihrer langen Achse verlaufen. [155]

Alle Zelllysate zeigten in den Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen diese Proteine stark immunreaktive Banden. Dies ist ein deutliches Zeichen ihrer mesenchymalen, myofibroblastischen Eigenschaften. [105,156,157]

Als epitheliale Marker dienten E-Cadherin und Zytokeratin 8. Ersteres war in keiner der Proben nachweisbar. Dies kann auf den Verlust des epithelialen Phänotyps bezogen werden und spricht somit für eine EMT. [52,55,79,115]

Beim Zytokeratin 8 zeigten drei der fünf getesteten Fistel-Proben starke immunreaktive Banden. Der Nachweis dieses Intermediärfilaments in den

Myofibroblasten-ähnlichen Zellen der Fisteln konnte immunozytochemisch bestätigt werden. Da Zytokeratin 8 ein epitheliales Intermediärfilament darstellt, dürfte es in Myofibroblasten, also mesenchymalen Zellen, nicht vorkommen. [96] Dies zeigt sich auch bei den Proben aus Stenosen und Entzündungen, die nur minimale, wahrscheinlich auf geringgradige Verunreinigungen zurückzuführende, immunreaktive Banden aufwiesen. Die starke Expression des Zytokeratin 8 in den Myofibroblasten-ähnlichen Zellen der Fisteln ist als ein Zeichen der epithelialen Abstammung im Sinne einer EMT zu interpretieren. [102]

Laut diesen Ergebnissen kann man die Myofibroblasten-ähnlichen Zellen als Mesenchymzellen bezeichnen, wobei die teilweise vorhandene Expression von Zytokeratin 8 auf eine epitheliale Genese schließen lässt. Dies untermauert das Vorliegen einer EMT.

TGF- β 1 und TGF- β 2:

Anschließend wurde noch die Expression des TGF- β 1 und des TGF- β 2 untersucht. Erstgenanntes konnte nur in den Lysaten der Myofibroblasten-ähnlichen Zellen aus den Fisteln detektiert werden. Diesem Zytokin wird, wie bereits erläutert, eine herausragende Rolle bei der Induzierung der EMT zugeschrieben. [56,145,150] Außerdem ergaben Experimente anderer Arbeitsgruppen, dass Post-EMT-Zellen eine autonome TGF- β -Produktion aufrechterhalten. [135]

TGF- β 2 war in keiner der Proben detektierbar, was zum einen daran liegen könnte, dass die Proteinmenge unterhalb der Nachweisschwelle des Antikörpers von 25 ng lag. Zum anderen kann es aber auch darauf hinweisen, dass TGF- β 2 entweder bei der Fistel-EMT insgesamt oder in diesem Stadium der EMT keine Bedeutung hat. [142,143]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gefundene Expression von TGF- β 1 ein weiteres Anzeichen für das Vorliegen einer EMT ist und TGF- β 2 während diesem Vorgang scheinbar eine untergeordnete Rolle spielt.

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Abbildung 5-1 zeigt graphisch die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse in einer Übersicht. Zusammenfassend kann damit festgestellt werden, dass alles auf eine Mitbeteiligung der EMT bei der Entstehung von Fisteln bei Patienten mit Morbus Crohn deutet. Diese Aussage kann getroffen werden, da nicht nur keine der durchgeführten Untersuchungen gegen einen solchen Vorgang spricht, sondern vielmehr die in der Übergangszone der Fisteln gefundene *de novo*-Expression von Integrin $\alpha V\beta 6$ und TGF- $\beta 1$ und die gleichzeitige Reduktion von zellwandständigem E-Cadherin und β -Catenin eindeutige Argumente für eine EMT sind. Auch das gleichzeitige Auftreten von mesenchymalen und epithelialen Markern in den Myofibroblasten-ähnlichen Zellen ist ein charakteristisches Zeichen für deren Genese durch eine EMT.

Trotz allem sollte dieser Nachweis der EMT einen Anlass für weitere Untersuchungen darstellen. Zum einen wäre die genaue Kenntnis der Induktoren einer solchen Transformation und von Faktoren, die deren Ablauf verstärken, hilfreich. Dies würde höchstwahrscheinlich neue und gezieltere Angriffspunkte für zukünftige medikamentöse Therapien der Fisteln liefern. An Epithelzellen der Niere konnte z. B. bereits gezeigt werden, dass BMP7 eine durch TGF- $\beta 1$ induzierte EMT wieder umkehren kann. [86,158] Auch ein noch besseres Verständnis der ablaufenden Signalwege kann einen Beitrag zu diesem Ziel liefern. Hierbei wären EMT-Studien an *in vitro* Modellen mit immortalisierten Zelllinien des Darms ein geeigneter Weg. So könnte man vielleicht bald das häufige und klinisch schwerwiegende Problem der Fisteln als Komplikation des Morbus Crohn besser in den Griff bekommen.

5.9 Ergebnisse der Arbeit in schematischer Übersicht

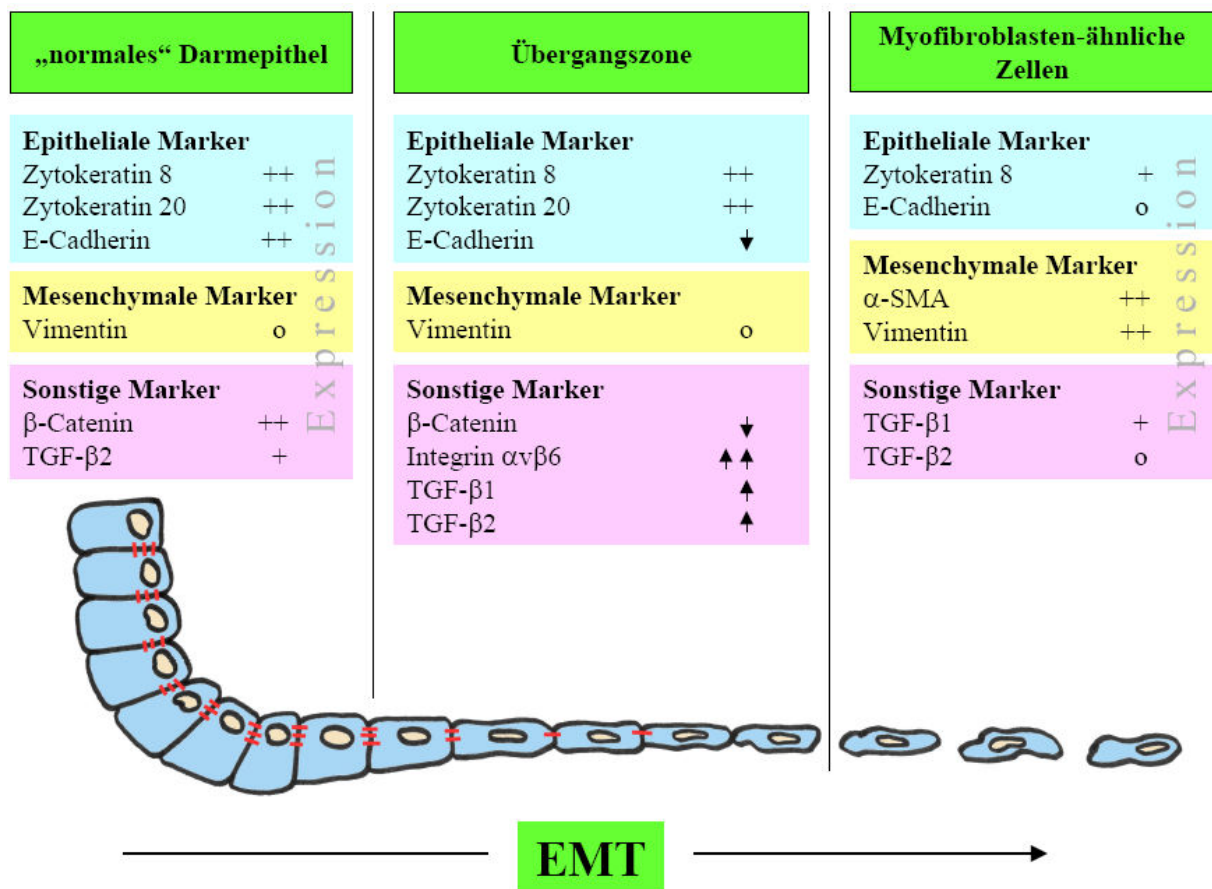


Abb. 5-1: Die Ergebnisse der Arbeit in schematischer Übersicht

Bild: Das „normale“ Darmepithel geht in den Fisteln in Myofibroblasten-ähnliche Zellen über, von denen angenommen wird, dass sie durch eine EMT entstanden sind. Dazwischen befindet sich eine Übergangszone, deren Zellen bereits flacher und mesenchymaler imponieren und die einen Verlust ihrer Zellkontakte (rote Striche) aufweisen.

„Normales“ Darmepithel: Stärke der Proteinexpression (Immunhistochemie)

++: starke Expression; +: schwache Expression; o: keine Expression

TGF-β1 und Integrin αvβ6 wurden nicht angegeben; sie waren nicht exprimiert.

Übergangszone: Expression bzw. Expressionsunterschied der Proteine im Vergleich zum „normalen“ Darmepithel (Immunhistochemie)

↑↑: starker Unterschied; ↑ oder ↓: schwacher Unterschied; ++: starke Expression; o: keine Expression
Die Unterschiede waren bis auf TGF-β2 signifikant.

Myofibroblasten-ähnliche Zellen: Stärke der Proteinexpression (Western Blot)

++: starke Expression; +: schwache Expression; o: keine Expression

6 ZUSAMMENFASSUNG

Viele an Morbus Crohn leidende Patienten bekommen im Verlauf ihrer Erkrankung Fisteln. Diese stellen für die Betroffenen eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität dar. Die bei der Entstehung einer solchen Komplikation ablaufenden Vorgänge sind zum jetzigen Zeitpunkt nur unzureichend bekannt.

Morphologisch zeigt sich bei der überwiegenden Anzahl der Fisteln eine Auskleidung durch Myofibroblasten-ähnliche Zellen. Zudem lässt sich eine Übergangszone vom „normalen“ Epithel z. B. des Darms in diese luminale Schicht abgrenzen. Veränderungen dieser Art sind charakteristisch für die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT). Bei solch einem Vorgang, der insbesondere bei der Progression von Karzinomen und bei fibrosierenden Krankheitsbildern stattfindet, entstehen aus Epithelverbänden deutlich beweglichere, mesenchymal imponierende Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung einer EMT bei der Entstehung von Fisteln bei Morbus Crohn-Patienten untersucht.

Dazu wurden 14 Fisteln aus Resektaten des Darms und drei aus dem perianalen Bereich immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigten sich in der genannten Übergangszone im Vergleich zum „normalen“ Epithel keine Veränderungen bei den Intermediärfilamenten Zytokeratin 8, Zytokeratin 20 und Vimentin. Es konnte jedoch ein signifikanter Rückgang von E-Cadherin und β -Catenin und eine signifikante *de novo* Expression von Integrin $\beta 6$ und TGF- $\beta 1$ nachgewiesen werden. Auch TGF- $\beta 2$ war stärker zu detektieren.

Weiter wurden Myofibroblasten-ähnliche Zellen aus den Fisteln isoliert und in Kultur gebracht. Die Expression verschiedener Proteine dieser Zellen, die laut aufgestellter Hypothese durch EMT entstanden sind, wurde mit Hilfe von Western Blots analysiert. Die Zellen enthielten α -SMA und Vimentin, jedoch kein E-Cadherin und kein TGF- $\beta 2$. Im Vergleich zu Myofibroblasten aus entzündeten und stenosierten Darmarealen zeigten sie eine Expression von TGF- $\beta 1$ und deutlich immunreaktive Banden für Zytokeratin 8. Letzteres konnte immunozytochemisch bestätigt werden.

Die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Untersuchungen sind charakteristisch für das Vorliegen einer EMT. Insbesondere der Rückgang von E-Cadherin und β -Catenin, sowie die *de novo* Expression von Integrin $\beta 6$ und

TGF- β 1 weisen auf einen solchen Vorgang hin. Gleiches gilt für die Western Blot-Analysen, bei denen vor allem der gleichzeitige Nachweis von epithelialen (Zytokeratin 8) und mesenchymalen (α -SMA, Vimentin) Markern ein EMT-Charakteristikum darstellt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse für das Vorliegen einer EMT bei der Entstehung von Fisteln bei Morbus Crohn-Patienten sprechen. Dies bietet einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen und auf Dauer vielleicht auch für neue Strategien in der Therapie dieser bisher nur unzureichend behandelbaren Komplikation.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease - an update. *Inflamm Bowel Dis* 1995; 1:220-227.
- [2] Feldman M, Boland CR. The Comprehensive Visual Reference: Colon, Rectum and Anus. *Gastroenterology and Hepatology* 1992; 2:16.
- [3] Stoll M, Schreiber S. Morbus Crohn: Zweites krankheitsassoziiertes Gen entdeckt. *Biologie in unserer Zeit* 2004; 34(4):208-209.
- [4] Bonen DK, Cho JH. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2003; 124:521-536.
- [5] Binder V, Orholm M. Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Netherlands Journal of Medicine* 1996; 48:53-56.
- [6] Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Färkkilä M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12(23):3668-3672.
- [7] Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJS, Bridger S, Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *The Lancet* 2001; 357:1925-1928.
- [8] Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP. CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70:845-857.
- [9] King K, Sheikh MF, Cuthbert AP, Fisher SA, Onnie CM, Mirza MM, Pattni RC, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Lewis CM, Roberts RG, Mathew CG. Mutation, Selection, and Evolution of the Crohn Disease Susceptibility Gene CARD15. *Human Mutation* 2006; 27:44-54.
- [10] Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJP, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The Contribution of NOD2 Gene Mutations to the Risk and Site of Disease in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2002; 122:867-874.
- [11] Heliö T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki, Turunen U, Färkkilä M, Krusius T, Kontula K. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familially occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003; 52:558-562.

-
- [12] Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B, D'halluin PN, Heresbach-Le Berre N, Dreano S, Siproudhis L, Dabadie A, Gosselin M, Mosser J, Semana G, Bretagne JF, Yaouanq J. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2004; 16:55-62.
- [13] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-606.
- [14] Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Gilles T. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599-603.
- [15] Rogler G. Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Current Opinion in Gastroenterology* 2004; 20:311-317.
- [16] Brant SR, Wang MH, Rawsthorne P, Sargent M, Datta LW, Nouvet F, Shugart YY, Bernstein CN. A Population-Based Case-Control Study of CARD15 and Other Risk Factors in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:1-11.
- [17] Fiocchi C. Non-stop progress in inflammatory bowel disease: new players, new understanding, new therapies. *Gastroenterology* 2006; 22:347-348.
- [18] Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester À, Tarján Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European Journal of Radiology* 2000; 35:154-167.
- [19] Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HMT, Schwartz MR, Naser S, Shafran I, El-Zaatari FAK. Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:337-346.
- [20] El-Zaatari FAK, Osato M, Graham DY. Etiology of Crohn's disease: the role of Mycobacterium avium paratuberculosis. *Molecular Medicine* 2001; 7(6):247-251.
- [21] Ellingson JLE, Cheville JC, Brees D, Miller JM, Cheville NF. Absence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis Components from Crohn's Disease Intestinal Biopsy Tissues. *Clinical Medicine & Research* 2003; 1(3):217-226.
- [22] Regueiro M, Kip KE, Cheung O, Hegazi RA, Plevy S. Cigarette Smoking and Age at Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(1):42-47.
- [23] Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, Di Paolo M, Riegler G, Rigo GP, Ferrau O, Mansi C, Ingrosso M, Valpiani D. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and

- breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. *International Journal of Epidemiology* 1998; 27:397-404.
- [24] Korzenik JR. Past and Current Theories of Etiology of IBD. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39:59-65.
- [25] Lerebours E, Gower-Rousseau C, Merle V, Brazier F, Debeugny S, Marti R, Salomez JL, Hellot MF, Dupas JL, Colombel JF, Cortot A, Benichou J. Stressful Life Events as a Risk Factor for Inflammatory Bowel Disease Onset: A Population-Based Case-Control Study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:1-10.
- [26] Adler G. *Morbus Crohn - Colitis Ulcerosa*. Springer Verlag. 1996.
- [27] Michelassi F, Stella M, Balestracci T, Giuliani F, Marogna P, Block GE. Incidence, diagnosis, and treatment of enteric and colorectal fistulae in patients with Crohn's disease. *Annals of Surgery* 1993; 218:660-666.
- [28] Solomon MJ. Fistulae and abscesses in symptomatic perianal Crohn's disease. *Int J Colorect Dis* 1996; 11:222-226.
- [29] Allan A, Keighley MR. Management of perianal Crohn's disease. *World J Surg* 1988; 12:198-202.
- [30] Bell SJ, Williams AB, Wiesel P, Wilkinson K, Cohen RCG, Kamm MA. The clinical course of fistulating Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:1145-1151.
- [31] Loftus EV jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology* 1998; 114:1161-1168.
- [32] Loftus EV jr, Schoenfeld P, Sandborn WJ. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 16:51-60.
- [33] Schwartz DA, Loftus EV jr, Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The Natural History of Fistulizing Crohn's Disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002; 122:875-880.
- [34] Hellers G, Bergstrand O, Ewerth S, Holstrom B. Occurrence and outcome after primary treatment of anal fistulae in Crohn's disease. *Gut* 1980; 21:525-527.
- [35] Felley C, Mottet C, Juillerat P, Froehlich F, Burnand B, Vader JP, Michetti P, Gonvers JJ. Fistulizing Crohn's Disease. *Digestion* 2005; 71:26-28.
- [36] Present DH. Crohn's Fistula: Current Concepts in Management. *Gastroenterology* 2003; 124:1629-1635.
- [37] Present DH. Urinary Tract Fistulas in Crohn's Disease: Surgery Versus Medical Therapy. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:2165-2167.

-
- [38] D'Haens G. Medical management of major internal fistulae in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6:244-245.
- [39] Savoye G, Koning E, Savoye-Collet C, Tuech JJ, Lerebours E. Gastrointestinal: Fistulae in Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006; 21:621.
- [40] Givel JC, Hawker P, Allan R, Keighley MR, Alexander-Williams J. Enterointestinal fistula complicating Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 1983; 5(4):321-323.
- [41] O'Hanlon DM, O'Connell PR. Complex fistulae in Crohn's disease. *J Am Coll Surg* 2002; 194:87.
- [42] Hoffmann JC, Zeitz M. Treatment of Crohn's disease. *Hepatogastroenterology* 2000; 47:90-100.
- [43] Francois Y, Vignal J, Descos L. Outcome of perianal fistulae in Crohn's disease - value of Hughes' pathogenic classification. *Int J Colorect Dis* 1993; 8:39-41.
- [44] Takesue Y, Ohge H, Yokoyama T, Murakami Y, Imamura Y, Sueda T. Long-term results of seton drainage on complex anal fistulae in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol* 2002; 37:912-915.
- [45] Williams JG, MacLeod CA, Rothenberger DA, Goldberg SM. Seton treatment of high anal fistulae. *Br J Surg* 1991; 78:1159-1161.
- [46] Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, Van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Van Deventer SJI. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340:1398-1405.
- [47] Bell SJ, Kamm MA. Review article: the clinical role of anti-TNFalpha antibody treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14:501-514.
- [48] Present DH. Review article: the efficacy of infliximab in Crohn's disease - healing of fistulae. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13 Suppl 4:23-28.
- [49] Oberhuber G, Stangl PC, Vogelsang H, Schober E, Herbst F, Gasche C. Significant association of strictures and internal fistula formation in Crohn's disease. *Virchows Arch* 2000; 437:293-297.
- [50] Hughes LE. Surgical pathology and management of anorectal Crohn's disease. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1978; 71:644-651.
- [51] Bataille F, Klebl F, Rümmele P, Schroeder J, Farkas S, Wild PJ, Fürst A, Hofstädter F, Schölmerich J, Herfarth H, Rogler G. Morphological characterisation of Crohn's disease fistulae. *Gut* 2004; 53:1314-1321.
- [52] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Cell Biology* 2003; 15:740-746.

-
- [53] Boyer B, Vallés AM, Edme N. Induction and Regulation of Epithelial-Mesenchymal transitions. *Biochemical Pharmacology* 2000; 60:1091-1099.
- [54] Kang P, Svoboda KKH. Epithelial-Mesenchymal Transformation during Craniofacial Development. *J Dent Res* 2005; 84(8):678-690.
- [55] Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews* 2006; 7:131-142.
- [56] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews* 2002; 2:442-454.
- [57] Kang Y, Massagué J. Epithelial-Mesenchymal Transitions: Twist in Development and Metastasis. *Cell* 2004; 118:277-279.
- [58] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology* 2005; 17:548-558.
- [59] Zeisberg M, Maeshima Y, Mostermann B, Kalluri R. Renal Fibrosis: Extracellular Matrix Microenvironment Regulates Migratory Behavior of Activated Tubular Epithelial Cells. *Am J Pathol* 2002; 160:2001-2008.
- [60] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110:341-350.
- [61] Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial Origin of Myofibroblasts during Fibrosis in the Lung. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:377-382.
- [62] Chilosì M, Poletti V, Zamo A, Lestani M, Montagna L, Piccoli P, Pedron S, Bertaso M, Scarpa A, Murer B, Cancellieri A, Maestro R, Semenzato G, Doglioni C. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2003; 162:1495-1502.
- [63] Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li Y-H, Rojkind M, Diehl AM. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291:G575-G583.
- [64] Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004; 114:569-581.
- [65] Bates RC, DeLeo MJ 3rd, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis. *Exp Cell Res* 2004; 299:315-324.
- [66] Bates RC. Colorectal Cancer Progression - Integrin α V β 6 and the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). *Cell Cycle* 2005; 4(10):1350-1352.

-
- [67] Whitbread AK, Veveris-Lowe TL, Lawrence MG, Nicol DL, Clements JA. The role of kallikrein-related peptidases in prostate cancer: potential involvement in an epithelial to mesenchymal transition. *Biol Chem* 2006; 387:707-714.
- [68] Katoh M. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (Review). *Int J Oncol* 2005; 27(6):1677-1683.
- [69] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112:1776-1784.
- [70] Yang J, Liu Y. Dissection of Key Events in Tubular Epithelial to Myofibroblast Transition and Its Implications in Renal Interstitial Fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 159:1465-1475.
- [71] Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, Colorado P, Müller GA, Strutz F, Kalluri R. Renal Fibrosis: Collagen Composition and Assembly Regulates Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation. *Am J Pathol* 2001; 159:1313-1321.
- [72] Fan JM, NG YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; 56:1455-1467.
- [73] Morali OG, Delmas V, Moore R, Jeanney C, Thiery JP, Larue L. IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 2001; 20:4942-4950.
- [74] Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 2002; 61:1714-1728.
- [75] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425:577-584.
- [76] Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays* 2001; 23:912-923.
- [77] Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int* 2002; 26(5):463-476.
- [78] Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W. Loss of Epithelial Differentiation and Gain of Invasiveness Correlates with Tyrosine Phosphorylation of the E-Cadherin/beta-Catenin Complex in Cells Transformed with a Temperature-sensitive v-SRC Gene. *The Journal of Cell Biology* 1993; 120(3):757-766.
- [79] Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology* 2006; 172(7):973-981.
- [80] Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem Cells and beta-Catenin. *Cells Tissues Organs* 2005; 179:56-65.

-
- [81] Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG. The Gatekeeper Effect of Epithelial-Mesenchymal Transition Regulates the Frequency of Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research* 2003; 63:3386-3394.
- [82] Fischer ANM, Fuchs E, Mikula M, Huber H, Beug H, Mikultis W. PDGF essentially links TGF-beta signalling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression. *Oncogene* 2006;1-11.
- [83] Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10356-10361.
- [84] Neilson EG. Setting a trap for tissue fibrosis. *Nat Med* 2005; 11:373-374.
- [85] Sommer M, Gerth J, Stein G, Wolf G. Transdifferentiation of Endothelial and Renal Tubular Epithelial Cells into Myofibroblast-Like Cells under in vitro Conditions: A Morphological Analysis. *Cells Tissues Organs* 2005; 180:204-214.
- [86] Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9:964-968.
- [87] Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, Kooten van C, Müller GA. TGF-beta1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 2001; 59:579-592.
- [88] Liu Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1-12.
- [89] Giorno R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol* 1984; 2(3):161-166.
- [90] Bates RC. Colorectal Cancer Progression - Integrin alphaVbeta6 and the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). *Cell Cycle* 2005; 4(10):1350-1352.
- [91] Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24:5764-5774.
- [92] Eger A, Stockinger A, Park J, Langkopf E, Mikula M, Gotzmann J, Mikulits W, Beug H, Foisner R. beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 2004; 23:2672-2680.
- [93] Oft M, Heider K-H, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 1998; 8:1243-1252.
- [94] Zvaifler NJ. Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapie* 2006; 8:210-220.

-
- [95] Wildi S, Kleeff J, Maruyama H, Maurer CA, Friess H, Büchler MW, Lander AD, Korc M. Characterization of Cytokeratin 20 Expression in Pancreatic and Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 1999; 5:1840-2847.
- [96] Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002; 40:403-439.
- [97] Kende AI, Carr NJ, Sobin LH. Expression of cytokeratins 7 and 20 in carcinomas of the gastrointestinal tract. *Histopathology* 2003; 42:137-140.
- [98] Rees JRE, Onwuegbusi BA, Save VE, Alderson D, Fitzgerald RC. In vivo and In vitro Evidence for Transforming Growth Factor-beta1-Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition in Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Res* 2006; 66(19):9583-9590.
- [99] Sam R, Wana L, Gudehithlu KP, Garber SL, Dunea G, Arruda JAL, Singh AK. Glomerular epithelial cells transform to myofibroblasts: early but not late removal of TGF-beta1 reverses transformation. *Translational Research* 2006; 148(3):142-148.
- [100] Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research* 2005; 6(56).
- [101] Compton LA, Potash DA, Mundell NA, Barnett JV. Transforming Growth Factor-beta Induces Loss of Epithelial Character and Smooth Muscle Cell Differentiation in Epicardial Cells. *Developmental Dynamics* 2006; 235:82-93.
- [102] DAKO. *Produktbeschreibung von anti-Cytokeratin 8 Antikörper Klon 35betaH11*. 2005.
- [103] Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, duBois RM, Borok Z. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor-beta1: Potential Role in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* 2005; 166:1321-1332.
- [104] Forino M, Torregrossa R, Ceol M, Murer L, Vella MD, Prete DD, D'Angelo A, Anglani F. TGFbeta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture. *Int J Exp Path* 2006; 87:197-208.
- [105] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH. 2004.
- [106] Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, Busslinger M, Berg H. Activation of an Inducible c-FosER Fusion Protein Causes Loss of Epithelial Polarity and Triggers Epithelial-Fibroblastoid Cell Conversion. *Cell* 1992; 71:1103-1116.
- [107] Janda E, Nevolo M, Lehmann K, Downward J, Beug H, Grieco M. Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. *Oncogene* 2006;1-14.

-
- [108] Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-Cadherin Suppresses Cellular Transformation by Inhibiting beta-Catenin Signaling in an Adhesion-independent Manner. *The Journal of Cell Biology* 2001; 153:1049-1059.
- [109] Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4246-4250.
- [110] Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, Haensch W, Birchmeier W, Schlag PM. Immunohistological Analysis of E-Cadherin, alpha-, beta- and gamma-Catenin Expression in Colorectal Cancer: Implications for Cell Adhesion and Signaling. *Eur J Cancer* 1999; 35:60-65.
- [111] Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48:365-375.
- [112] Huang HC, Hu CH, Tang MC, Wang WS, Chen PM, Su Y. Thymosin beta4 triggers an epithelial-mesenchymal transition in colorectal carcinoma by upregulating integrin-linked kinase. *Oncogene* 2006;1-10.
- [113] Imhof BA, Vollmers HP, Goodman SL, Birchmeier W. Cell-cell interaction on polarity of epithelial cells: specific perturbation using a monoclonal antibody. *Cell* 1983; 35:667-675.
- [114] Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198:11-26.
- [115] Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2:76-83.
- [116] Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta Induced Transdifferentiation of Mammary Epithelial Cells to Mesenchymal Cells: Involvement of Type I Receptors. *The Journal of Cell Biology* 1994; 127:2021-2036.
- [117] Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 2006;1-14.
- [118] Naishiro Y, Yamada T, Takaoka AS, Hayashi R, Hasegawa F, Imai K, Hirohashi S. Restoration of Epithelial Cell Polarity in a Colorectal Cancer Cell Line by Suppression of beta-catenin/T-Cell Factor 4-mediated Gene Transactivation. *Cancer Res* 2001; 61:2751-2758.
- [119] Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem Cells and beta-Catenin. *Cells Tissues Organs* 2005; 179:56-65.

-
- [120] Hertig A, Verine J, Mougenot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, Glotz D, Ancel PY, Rondeau E, Xu-Dubois YC. Risk Factors for Early Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Grafts. *American Journal of Transplantation* 2006; 6:2937-2946.
- [121] Eger A, Stockinger A, Park J, Langkopf E, Mikula M, Gotzmann J, Mikulits W, Beug H, Foisner R. beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 2004; 23:2672-2680.
- [122] Logan YC, Miller JR, Ferkowicz MJ, McClay DR. Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. *Development* 1999; 126:345-357.
- [123] Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A, Augenlicht LH. Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res* 2001; 61:3465-3471.
- [124] Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* 1999; 112:1237-1245.
- [125] Sadot E, Simcha I, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger B. Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15339-15344.
- [126] Larabell CA, Torres M, Rowning BA, Yost C, Miller JR, Wu M, Kimelman D, Moon RT. Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* 1997; 136:1123-1136.
- [127] Bataille F (mündliche Mitteilung). Erfahrungen der Arbeitsgruppe an Kolonkarzinomen. 2007.
- [128] Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H, Foisner R. Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol* 2000; 148:173-188.
- [129] Thomas GJ, Nyström ML, Marshall JF. alphaVbeta6 integrin in wound healing and cancer of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2006; 35:1-10.
- [130] Thomas GJ, Poomsawat S, Lewis MP, Hart IR, Speight PM, Marshall JF. alphaVbeta6 Integrin Upregulates Matrix Metalloproteinase 9 and Promotes Migration of Normal Oral Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2001; 116:898-904.
- [131] Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittet JF, Nishimura SL, Aldape K, Landers DV, Carpenter W, Gillett N, Sheppard D, Matthay MA, Albelda SM, Kramer RH, Pytela R. Expression of the beta6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 1995; 108:2241-2251.

-
- [132] AlDahlawi S, Eslami A, Häkkinen L, Larjava HS. The alphaVbeta6 integrin plays a role in compromised epidermal wound healing. *Wound Rep Reg* 2006; 14:289-297.
- [133] Häkkinen L, Koivisto L, Gardner H, Saarialho-Kere U, Carroll JM, Lakso M, Rauvala H, Laato M, Heino J, Larjava H. Increased Expression of beta6-Integrin in Skin Leads to Spontaneous Development of Chronic Wounds. *Am J Pathol* 2004; 164:229-242.
- [134] Regezi JA, Ramos DM, Pytela R, Dekker NP, Jordan RCK. Tenascin and beta6 integrin are overexpressed in floor of mouth in situ carcinomas and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* 2002; 38:332-336.
- [135] Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest* 2005; 115:339-347.
- [136] Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha V beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96:319-328.
- [137] Annes JP, Rifkin DB, Munger JS. The integrin alphaVbeta6 binds and activates latent TGFbeta3. *FEBS Letters* 2002; 511:65-68.
- [138] Sheppard D. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer and Metastasis Reviews* 2005; 24:395-402.
- [139] Hahm K, Lukashev ME, Luo Y, Yang WJ, Dolinski BM, Weinreb PH, Simon KJ, Wang LC, Leone DR, Lobb RR, McCrann DJ, Allaire NE, Horan GS, Fogo A, Kalluri R, Shield III CF, Sheppard D, Gardner HA, Violette SM. alphaVbeta6 Integrin Regulates Renal Fibrosis and Inflammation in Alport Mouse. *Am J Pathol* 2007; 170:110-125.
- [140] Keski-Oja J, Koli K, von Melchner H. TGF-beta activation by traction? *TRENDS in Cell Biology* 2004; 14:657-659.
- [141] Janes SM, Watt FM. Switch from alphaVbeta5 to alphaVbeta6 integrin expression protects squamous cell carcinomas from anoikis. *J Cell Biol* 2004; 166:419-431.
- [142] Boyer AS, Ayerinkas II, Vincent EB, McKinney LA, Weeks DL, Runyan RB. TGFbeta2 and TGFbeta3 Have Separate and Sequential Activities during Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart. *Developmental Biology* 1999; 208:530-545.
- [143] Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032:79-87.
- [144] Yang Y, Pan X, Lei W, Wang J, Song J. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene* 2006;1-10.

-
- [145] Matsuzaki K, Okazaki K. Transforming growth factor-beta during carcinogenesis: the shift from epithelial to mesenchymal signaling. *J Gastroenterol* 2006; 41:295-303.
- [146] Fiocchi C. TGF-beta/Smad signaling defects in inflammatory bowel disease: mechanisms and possible novel therapies for chronic inflammation. *J Clin Invest* 2001; 108:523-526.
- [147] Esposito G, Kerasidas M, Mauduit C, Feige JJ, Morera AM, Benahmed M. Direct regulation effects of transforming growth factor-beta 1 on lactate production in cultured porcine Sertoli cells. *Endocrinology* 1991; 128:1441-1449.
- [148] Pittet JF, Griffiths MJD, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, Brown LAS, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Matthay MA, Sheppard D. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 2001; 107:1537-1544.
- [149] Zhu HJ, Burgess AW. Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol Cell Biol Res Commun* 2001; 4:321-330.
- [150] Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 2004; 82:175-181.
- [151] Yao HW, Xie QM, Chen JQ, Deng YM, Tang HF. TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Life Sciences* 2004; 76:29-37.
- [152] De Jongh RU, Wederell E, Lovicu FJ, McAvoy JW. Transforming Growth Factor-beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in the Lens: A Model for Cataract Formation. *Cells Tissues Organs* 2005; 179:43-55.
- [153] Leeb S. Einfluss von Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Mediatoren auf die autokrine Fibronektin-induzierte Migration von humanen intestinalen Myofibroblasten. 2002. Dissertation, Universität Regensburg.
- [154] Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation. *Experimental Cell Research* 1999; 250:273-283.
- [155] Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:141-147.
- [156] Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, Heukeshoven J, Pantel K. Changes in Cytoskeletal Protein Composition Indicative of an Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Micrometastatic and Primary Breast Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11(22):8006-8014.
- [157] Masszi A, Di Ciano C, Sirokmány G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284:911-924.

-
- [158] Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone Morphogenic Protein-7 Induces Mesenchymal to Epithelial Transition in Adult Renal Fibroblasts and Facilitates Regeneration of Injured Kidney. *J Biol Chem* 2005; 280:8094-8100.

8 ANHANG

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Rohrmeier
Geburtsdatum: 14.08.1982
Geburtsort: Straubing
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch
Eltern: Helga Maria Anna Rohrmeier, Dipl. Sozialpädagogin (FH)
Dr. med. Michael Rohrmeier, Hals-Nasen-Ohren-Arzt
Geschwister: Cornelia Rohrmeier, geb. 30.03.1986, Logopädin

Schule und Studium

1988 – 1993 Besuch der Volksschule St. Peter in Straubing
1993 – 2002 Besuch des Ludwigsgymnasiums in Straubing
Abschluss mit dem Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
2002 – 2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg:
Vorklinischer Abschnitt
Abschluss mit der Ärztlichen Vorprüfung
2004 – 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg:
Klinischer Abschnitt
Abschluss mit dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Veröffentlichungen

Bataille F, Rohrmeier C, Bates R, Weber A, Rieder F, Brenmoehl J, Strauch U, Farkas S, Fürst A, Hofstädter F, Schölmerich J, Herfarth H, Rogler G. Evidence for a Role of Epithelial Mesenchymal Transition During Pathogenesis of Fistulae in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14:1514-1527.

8.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler für die Überlassung dieses interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeitdauer der Arbeit.

Frau PD Dr. med. Frauke Bataille danke ich für die gute Betreuung und stete Hilfe bei Fragestellungen auf dem Gebiet der Pathologie.

Prof. Dr. Richard Bates schulde ich Dank für die Kooperation bei den Integrin $\beta 6$ -Immunhistochemien und Prof. Dr. med. Rainer Straub für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

Ein besonderes Dankeschön geht an Julia Brenmoehl, Claudia Hofmann, Katrin Menzel und Martin Hausmann für ihre große Hilfsbereitschaft und die immer freundliche Unterstützung und Beratung bei allen Problemen im Labor.

Ebenso möchte ich den technischen Assistentinnen Monika Artinger, Rita Brunner-Ploß, Doris Gaag und Sabine Troppmann für ihre Hilfe und die vielen Antworten auf meine Fragen danken.

Weiterer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Cornelia und meiner Freundin Sarah, die mich während der ganzen Zeitdauer der Arbeit immer bestens unterstützt und ermutigt haben und auf diese Weise mit zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Und zuletzt vielen Dank an alle, die ich hier möglicherweise vergessen habe!