

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
DIREKTORIN: PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**VERLUST DER SENSIBLEN UND NORADRENERGEN INNERVATION  
IN BENIGNEN KOLORECTALEN ADENOMATÖSEN POLYPEN –  
VERMUTLICHE ROLLE DER SEMAPHORINE 3F UND 3A**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Natallia Graf

2012



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
DIREKTORIN: PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**VERLUST DER SENSIBLEN UND NORADRENERGEN INNERVATION  
IN BENIGNEN KOLORECTALEN ADENOMATÖSEN POLYPEN –  
VERMUTLICHE ROLLE DER SEMAPHORINE 3F UND 3A**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Natallia Graf

2012

Dekan

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Anja Bosserhoff

Tag der mündlichen Prüfung:

27.11.2012



# **Inhaltsverzeichnis**

## **1 Deutsche Zusammenfassung**

1.1 Einleitung und Fragestellung	1
1.2 Material und Methoden	4
1.2.a Gewebeproben	4
1.2.b Immunofluoreszenzfärbung der Semaphorine 3F und 3A	7
1.2.c Präsentation der Daten und statistische Analyse	8
1.3 Ergebnisse	9
1.3.a Noradrenerge und sensible Innervation der Polypen	9
1.3.b Expression der Semaphorine 3F und 3A in tumorfreiem Kontrollgewebe und in Polypen	12
1.4 Diskussion	16
1.5 Zusammenfassung	20

## **2 Literaturverzeichnis** 21

## **3 Publikation** 26

## **4 Danksagung** 37

## **5 Lebenslauf** 38

# 1 Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung und Fragestellung

Die kolorektalen Karzinome können sich aus den adenomatösen Polypen entwickeln, aber wie dieses Ereignis auf der molekularen Ebene abläuft steht immer noch zur Diskussion [1]. Die meisten familiären und sporadischen Fälle entstehen durch die maligne Transformation der benignen Adenome in einem Prozess, der schon in den 50er-Jahren als Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben wurde [2]. 30 bis 40% der westlichen Bevölkerung entwickeln im Laufe des Lebens Adenome, allerdings entartet nur 3% derer zum Karzinom [3,4]. Basierend auf diesen Kenntnissen wurden weltweit die Screening-Programme ins Leben gerufen [5].

Die Fortschritte der letzten 30 Jahre der Forschung in diesem Gebiet erlauben den molekularen Mechanismus der Kolonkanzerogenese besser zu verstehen [6]. Allerdings ist noch eine erhebliche Arbeit erforderlich, um den genauen Weg der Progression von benignen Polypen zum Kolonkarzinom zu begreifen. Es gibt mehrere Adenomen-Charakteristiken, welche mit erhöhtem Risiko einer malignen Transformation assoziiert sind, z.B. Größe, histologischer Typ, Grad der Entdifferenzierung und mehrere synchrone Läsionen [7,8]. Diese Charakteristiken zeigen, dass die mit dem Wachstum assoziierten Eigenschaften von kritischer Bedeutung für die maligne Transformation sind. Das sind besonders die Anzahl, Größe und villöse Komponente der kolorektalen Adenome, die die Prognose beeinflussen.

Obwohl die wachstumsfördernden Effekte von Neurotransmittern / Neuropeptiden bekannt sind [9-11], stand die Rolle der neuronalen Faktoren bei dem Wachstum der Adenome nicht im Fokus der Forschung. Da die Substanz P-positiven (SP+) sensiblen Nervenfasern und sympathischen katecholaminergen Nervenfasern die Darmwand dicht innervieren [12-14], könnten die beiden Nervenfasertypen einen Einfluss auf die Entwicklung von Polypen haben. SP+ Nervenfasern können entweder intrinsisch den enteralen Nervenfasern entstammen [13] oder extrinsisch den sensiblen Nervenfasern,

welche zu der Hinterwurzel der Spinalganglien [15,16] bzw. innerhalb des Nervus vagus laufen [17].

In mehreren Studien wurde beschrieben, dass die SP eine pro-proliferative Rolle beim Epithelzellwachstum hat und in der Progression der epithelialen Tumore mitwirkt [18-20]. Die trophische Rolle der SP wird von den Neurokinin 1-Rezeptoren (*NK1*) gefördert [18-20]. SP-Rezeptoren sind in der Kolonmukosa nachgewiesen [21] und sie sind im Rahmen eines entzündlichen Prozesses im Gewebe vermehrt vorhanden [22]. Darüber hinaus wirkt SP vasodilatatorisch, was für die Aufrechterhaltung einer angemessenen Ernährung für das wachsende Gewebe wichtig ist.

Ähnliche pro-proliferative Wirkung auf Kolonmukosa wurde über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren festgestellt [23, 24]. Noradrenalin induziert pro-proliferative Reaktionen in den Epithelzellen hauptsächlich über  $\alpha$ -Adrenozeptoren [25-28] und über  $\beta$ -Adrenozeptoren übt es die gegenläufigen Effekte aus [29,30]. Die dichotome Wirkung von Noradrenalin hängt von den verschiedenen G-Proteingekoppelten Adrenozeptoren ab mit polaren Effekten auf dem cAMP / Proteinkinase A / CREB-Signalweg. Da Noradrenalin mit höherer Affinität zu  $\alpha$ -Adrenozeptoren bindet (Induktion des niedrigen cAMP-Spiegels und Aktivierung Proteinkinase C) [31], sind die geringen Konzentrationen des Noradrenalins wachstumsfördernd, während die hohen das Epithelzellwachstum hemmen (hohe cAMP).

Auf diese Weise ist das Vorhandensein des jeweiligen Nervenfasertypes (entweder des sympathischen Noradrenalin-positiven oder sensiblen SP+) von Bedeutung für die Konzentrationen der Neurotransmitter und hat Auswirkungen auf das Wachstum des epithelialen Gewebes. Übergewicht von SP über Noradrenalin wirkt fördernd auf die Entwicklung der Darmpolypen.

Aber wie ist das Zusammensein der unterschiedlichen Nervenfasern im Polyp reguliert?

Regulation des Wachstums der Nervenfasern durch Wachstumsfaktoren und deren Lenkung durch Axonlenkungsmoleküle, wie z.B. Semaphorine, war ein wichtiger Bestandteil der neurowissenschaftlichen Forschung in den letzten Dekaden [32-37]. Während die Nervenwachstumsfaktoren üblicherweise unspezifisch wirken, sind die Axonlenkungsmoleküle spezifisch. Letztens



bekamen die Axonlenkungsmoleküle viel Aufmerksamkeit, denn sie bestimmen spezifisch die Dichte der peripheren Nervenfasern [32-37]. Die wichtigen Gruppen der Axonlenkungsmoleküle sind Semaphorine mit ihren Rezeptoren, Neutropiline und Plexine; sie weisen spezifisch noradrenerge und sensible Nervenfasern ab [38, 39]. Darüber hinaus spielen diese Substanzen, die nicht nur für die Wegfindung der Axone verantwortlich sind, eine Rolle bei den Darmentzündungen [40]. Außerdem steht die Expression der Semaphorine und deren Rezeptoren im Zusammenhang mit der Entwicklung der intestinalen epithelialen Tumore und Metastasen, die genaue Bedeutung dieser neuronalen Lenkung durch Semaphorine ist allerdings aktuell noch nicht genau erklärt [43].

Während Semaphorin 3F (*SEMA3F*) die sympathischen Nervenfasern abweist, stoßt Semaphorin 3A (*SEMA3A*) sensible Nervenfasern ab. So entscheidet der Unterschied in der Ausprägung der Semaphorine über die Dichte dieser zwei Typen der Nervenfasern in dem peripheren Gewebe [40-42].

Aus dieser Sicht sollte man die Dichte der peripheren Nervenfasern immer im Zusammenhang mit der Expression der spezifischen Semaphorine erforschen.

Diese Studie untersucht gezielt die Dichten der noradrenergen Tyrosinhydroxylase-positiven (*TH+*) und sensiblen SP+ Nervenfasern in den benignen adenomatösen Polypen des Darms zusammen mit der Expression der Axonlenkungsmoleküle SEMA3F (sympatisch) und SEMA3A (sensibel). Die Ergebnisse von der Auszählung der Nervenfasern in den Polypen wurden mit den entsprechenden Zahlen in der Mukosa und Submukosa des Kontrollgewebes aus dem gesunden Darm verglichen.

## **1.2 Material und Methoden**

### **1.2.a Gewebeproben**

Die ethische Zulassung für diese Studie wurde von den Ethik-Kommissionen an der Universität Aberdeen (UK) und der Universität Regensburg erhalten.

Insgesamt waren es zehn Proben der tubulären kolorektalen adenomatösen Polypen, welche man einer detaillierten histologischen Untersuchung (ohne vorherige Selektion) unterzogen hat. Die Polypen waren während der Colonoskopie bei den Vorsorgeuntersuchungen der Patienten in der gastroenterologischen Abteilung der Universitätsklinik in Aberdeen entnommen.

Die Proben wurden in das Institut für Pathologie in einer Fixationslösung aus 4% Formalin (neutral gepuffert) zur Routinediagnostik gebracht. Jede Probe war von einem erfahrenen Pathologen zur Bestätigung der histologischen Diagnose mit der Feststellung des Grades der epithelialen Dysplasie untersucht worden.

Die makroskopische Größe von jedem Polyp wurde nach der Fixation und vor der Einbettung als Teil der pathologischen Analyse gemessen.

Diese zehn Proben stammten von den tubulären Adenomen mit low-grade Dysplasie und waren zwischen 3 u 8 mm groß. Von jedem Polypen waren insgesamt zehn Schnitte für die Analyse verfügbar.

Die Kontrollproben wurden den Patienten entnommen, die sich im Universitätsklinikum Regensburg einer gastrointestinalen Operation in Rahmen der Behandlung des Kolonkarzinoms unterzogen haben. Die Kontrollproben stammten aus einem dem Tumor entfernten Areal (mindestens 10 cm) und wurden durch eine histopathologische Begutachtung als frei von Tumorerinfiltration befunden. Von dem gleichen Tumorgewebe wurden die Proben der kolorektalen Karzinome entnommen. Die für diese Studie histologisch untersuchten Kontrollproben hatten keine Entzündungszeichen.

Jeweils vier Schnitte von denen auf 3-aminopropyltriethoxysilane-beschichteten Objektträgern verwendete man anschließend für die Immunofluoreszenzfärbungen.

Alle Proben waren paraffineingebettet.

Histologische Untersuchung und Analyse der Immunfluoreszenzmikroskopie der Nervenfasern in den adenomatösen Polypen führte man im Bezug auf vier unterschiedlichen mikroanatomischen Zonen der Polypen (Fig. 1). Der Stiel des Polypen war durch typische Submukosa und durch ein Streifen von Muscularis mucosae deutlich von der Mukosa getrennt. Um die Dichte der Nervenfasern als Funktion des Abstandes von der Submukosa des Pedunculus zu beurteilen, wurde die gesamte Mukosa des Polypen in drei Drittel (äußere, mittlere und innere) aufgeteilt. Typische Histologie der vier unterschiedlichen Zonen des Polypen ist in Abbildung 1 demonstriert.

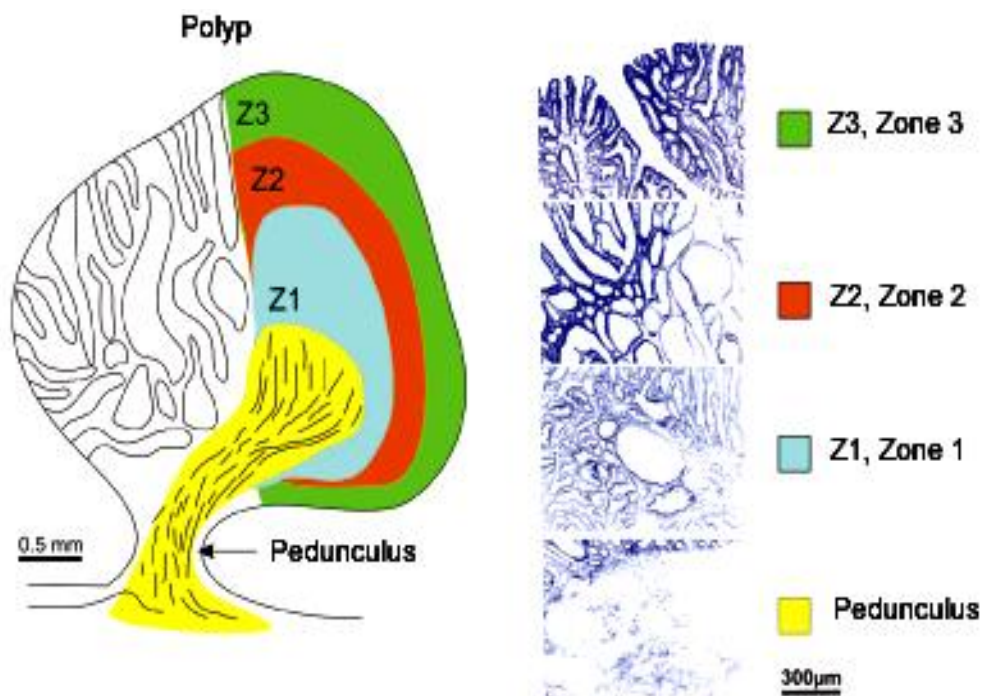


Abbildung 1. Analyse der Zonen der adenomatösen Darmpolypen.

*Die Pedunculus-Zone ist von den mukosalen Zonen durch typisch konfigurierte Submukosa und Muscularis mucosae getrennt. Die Mukosa wurde in drei gleich große Drittel (Zonen) geteilt (Z3 - äußeres Drittel, Z2 - mittleres Drittel und Z1 - inneres Drittel), um die Nervenfaserdichte in Abhängigkeit von der Entfernung zum Pedunculus zu untersuchen. Hämatoxylin-gefärbte Gewebeschnitte demonstrieren Histologie für jede Zone. Vergrößerung 50x.*

Die Innervation des Polypen wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.

Bei der Detektion der noradrenergen Nervenfasern richtete sich der primäre Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (TH, ein Schlüsselenzym für die Produktion des Noradrenalins in den noradrenergen Nervenendigungen [44]; rabbit polyclonal antibody, cat.no. AB152, Chemicon, Temecula, CA, USA).

Bei der Färbung der sensiblen Nervenfasern verwendete man den primären Antikörper gegen SP (ein Schlüsselneuropeptid der sensiblen Nervenfasern [45]; mouse monoclonal antibody, cat no. MAB4375, R&D Wiesbaden, Germany).

Die Gewebeschnitte wurden 12 bis 18 Stunden bei Raumtemperatur mit diesen Antikörpern inkubiert.

Für das Durchführen der Immunfluoreszenzfärbungen der noradrenergen und SP+ Nervenfasern wurden spezifische Alexa 546-konjugierte sekundäre Antikörper eingesetzt (cat. no. A-11010 against rabbit IgG und cat. no. A-11030 against mouse IgG, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands).

Die benötigte Wiederherstellung des Antigens für TH-Färbungen wurde durch 30-minütige Erhitzung im Puffer mit pH 9,0 erreicht.

Es wurden die Fasern jeweils in 17 randomisiert ausgewählten Feldern mit Vergrößerung 400x ausgezählt. Die Auszählung der einzelnen Nervenfasern erfolgte manuell, da die automatische oder halbautomatische Bildanalyse nicht möglich war.

Die Anzahl der Nervenfasern pro Quadratmillimeter in den unterschiedlichen Zonen des Polypen wurde als Mittelwert der ausgezählten gefärbten Nervenfasern ermittelt.

Die minimale Länge einer Nervenfaser wurde als 50  $\mu\text{m}$  festgelegt, sie war durch ein entsprechendes Längenmaß in der Optik des Mikroskops bestimmt.

Jede positive Färbung wurde durch das Mitführen der Negativkontrollen kontrolliert, welche immer negativ blieben. In einigen Fällen wurden die Zellkerne im Gewebe gegengefärbt durch 4'-6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma, München, Deutschland).

### **1.2.b Immunofluoreszenzfärbung der Semaphorine 3F und 3A**

Entparaffinierte Schnitte wurden mit den polyklonalen SEMA3F- und polyklonalen SEMA3A-Antikörpern für 12 bis 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (SEMA3F: cat.no AB5471P, Millipore, Temecula, USA; SEMA3A: cat.no ab23393, Abcam, Cambridge, UK).

Der Antikörper für die SEMA3F-Färbung ist gegen die lange Form dieses Proteins gerichtet, aber weil *in vivo* lange und kurze Formen des SEMA3F parallel existieren, könnte das festgestellte Expressionsmuster durch diese Tatsache beeinflusst werden. Die benötigte Wiederherstellung des Antigens wurde durch 30 - minütige Erhitzung im Puffer mit pH 9,0 erreicht.

Die sekundäre Färbung erfolgte mit Alexa 546-konjugiertem sekundärem Antikörper (cat. no. A-11010 against rabbit IgG, Molecular Probes). Die Negativkontrollen wurden durch das Neutralisieren des primären Antikörpers mit dem immunisierenden Antigen durchgeführt (SEMA3F: cat. no. AG363, Millipore Temecula, USA; SEMA3A: cat. no. ab88818, Abcam, Cambridge, UK); sie verliefen immer mit einem negativen Ergebnis (siehe Beilagen zu den SEMA3F- und SEMA3A-Färbungen unten).

Die positiven Kontrollfärbungen wurden vorher unter Verwendung der Krebszelllinien (Semaphorin 3A: MDA-MB-231) optimiert.

In manchen Fällen wurden die Zellkerne im Gewebe mit 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, Munich, Germany) gegengefärbt. In diesen Versuchsreihen haben wir festgestellt, dass die Epithelzellen die wichtigste Quelle der SEMA3F sind (Siehe Ergebnisse).

Wir verwendeten die folgende Methode um die epithelialen SEMA3F-positiven (SEMA3F+) Kryptenzellen zu quantifizieren: Wenn die Epithelzellen in einer horizontal angeschnittenen Krypta eine positive SEMA3F-Färbung zeigten, so wurde diese Krypta als SEMA3F+ definiert. Wenn die Epithelzellen einer gesamten U-förmigen Basis der längs angeschnittenen Krypta positiv für SEMA3F waren, wurde diese Krypta ebenso als positiv definiert.

Wir benutzten 17 randomisiert ausgewählte Felder mit Vergrößerung 400x in jeder Zone (Abb.1). Die Zahl 17 war ermittelt aus einer umfangreichen quantitativen histologischen Studie [46].

Die Anzahl der positiven horizontal und longitudinal getroffenen Krypten wurde in Bezug auf alle Krypten bestimmt (Einheit: Prozent aller Krypten).

Die Ermittlung der SEMA3A-positiven (SEMA3A+) Zellen erfolgte qualitativ ohne genaue Auszählung der Zellen.

### **1.2.c Präsentation der Daten und statistische Analyse**

Die Daten in den Abbildungen sind als Box-Plots präsentiert (Sigma Plot, V.12.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Die Grenze der Box am nächsten zum Null zeigt die 25. Perzentile, die Linie innerhalb der Box markiert den Median, die Begrenzung der Box am weitesten vom Null entspricht der 75. Perzentile. Whiskers (Fehlerbalken) oberhalb und unterhalb der Box zeigen die 90. und 10. Perzentile. Zwei unabhängige Datengruppen wurden durch den nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test (SPSS) verglichen. Abhängige Daten (Vergleich von Zonen miteinander; Vergleich der Dichte von verschiedenen Nervenfasern im selben Gebiet) wurden durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Test für gepaarte Daten (SPSS) verglichen und das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.a Noradrenerge und sensible Innervation der Polypen

Der Stiel der Polypen war dicht mit den noradrenergen Nervenfasern innerviert, welche nicht nur in der Nähe der Gefäße verliefen, sondern auch intervaskulär. Es wurden ganze Bündel der Perlenketten – noradrenerge Fasern – im Pedunculus nachgewiesen (Abb. 2).

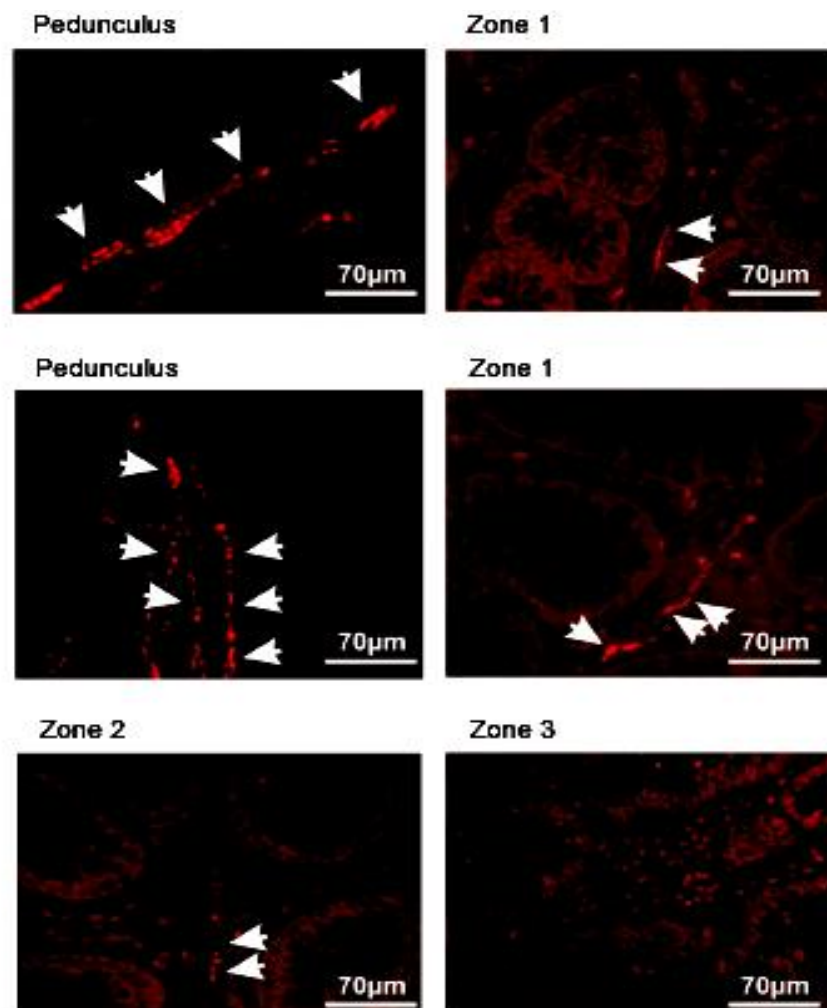


Abbildung 2. Noradrenerge Innervation der adenomatösen Darmpolypen.

*Perlenkettenähnliche Strukturen sind die noradrenergen Nerven, ganze Bündel und einzelne kleine Fasern. In den Zonen 1 bis 3 im Raum zwischen den Krypten sind noradrenerge Nervenfasern selten. In der Epithelzellschicht wurden keine noradrenergen Fasern entdeckt. Vergrößerung 400x.*

Es gab eine deutliche Reduktion der Dichte der noradrenergen Fasern außerhalb der Muscularis mucosae (vergleiche den Pedunculus mit Zone 1 in Abb. 2). Die noradrenerge Innervation nahm allmählich von Zone 1 zur Zone 3 ab (Abb. 2). Im Gewebe zwischen den Krypten befanden sich nur sehr wenige TH+ Zellen.

Wie bei den noradrenergen Fasern, befanden sich die meisten sensiblen SP+ Nervenfasern im Pedunculus (Abb. 3).

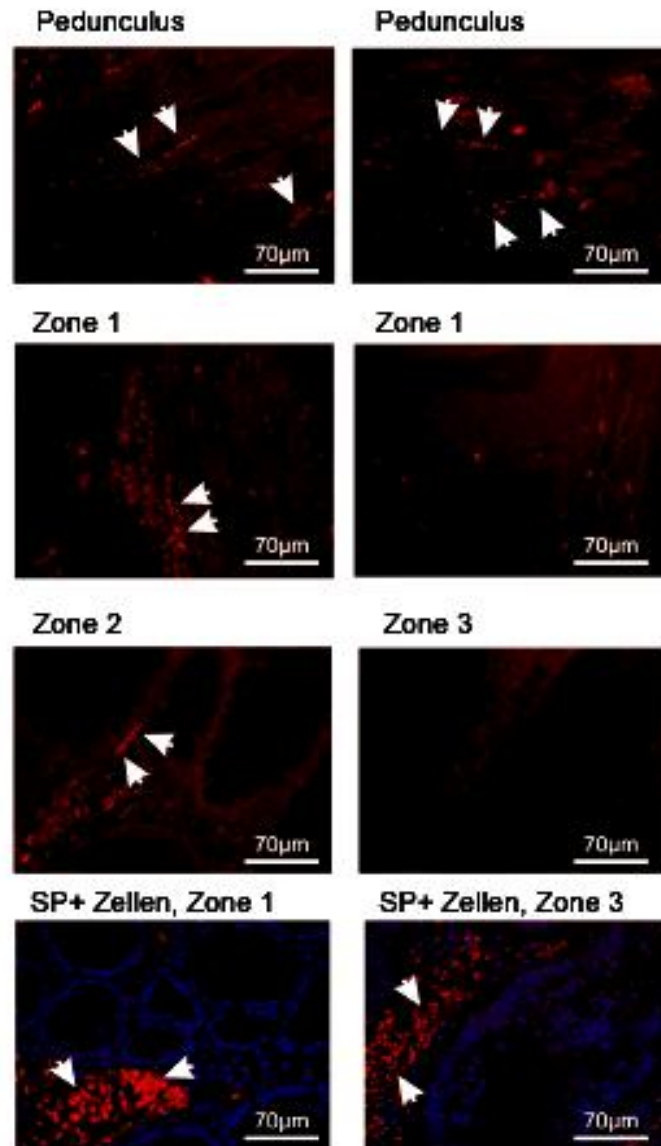


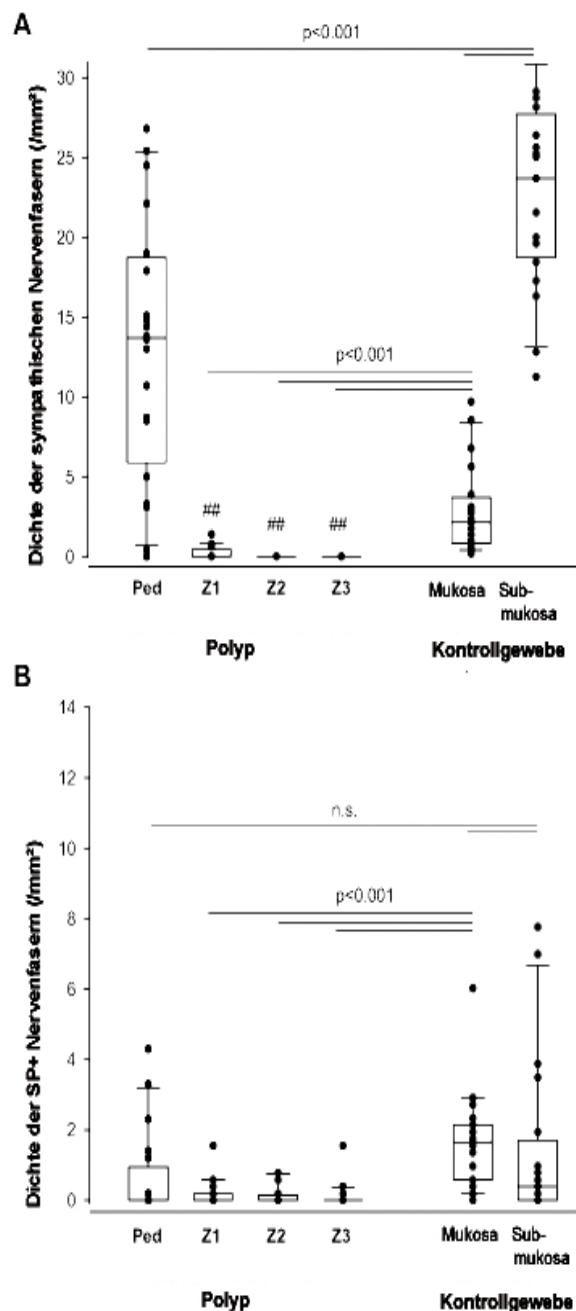
Abbildung 3. Sensible Innervation der adenomatösen Darmpolypen.

*Im Pedunculus sind die perlenkettenähnliche Strukturen - SP+ Nervenfasern - sichtbar. In Zonen 1 und 2 zwischen den Krypten sind die sensiblen Nervenfasern selten, in der Zone 3 wurden keine sensiblen Nervenfasern festgestellt. In der Epithelzellschicht befanden sich auch keine sensiblen Nervenfasern. Die Blau-Färbung in der Abbildung entspricht der Kernfärbung mit DAPI. Vergrößerung 400x.*



Während in Zone 1 und Zone 2 die SP+ Innervation sehr niedrig war, zeigte sich Zone 3 frei von der sensiblen Innervation (Abb. 3). In den Räumen zwischen den Krypten wiesen die SP+ Zellen eine Follikel-ähnliche Struktur auf (Abb. 3, unten). Das bedeutet, dass die Konzentration der SP, unabhängig von dem Vorhandensein der SP+ sensiblen Nervenfasern, hoch sein kann.

Die quantitative Auswertung der Dichte der noradrenergen Fasern demonstriert einen klaren Unterschied zwischen Pedunculus und Mukosa. (Abb. 4A).



A) Dichte der noradrenergen Nervenfasern im Pedunculus (Ped) und in den drei mukosalen Zonen (Z1- Z3)

Zum Vergleich sind die Dichten von Nervenfasern in tumorfreiem Kontrollgewebe (Mukosa und Submukosa) gegeben. Es wurden 20 Schnitte von zehn Polypen und Schnitte von tumorfreiem Kontrolldarmgewebe von 20 Patienten verwendet. # #  $p < 0,001$  versus Pedunculus.

B) Dichte der SP+ Nervenfasern im Pedunculus und in den drei mukosalen Zonen.

Zum Vergleich sind die Dichten von Nervenfasern in tumorfreier Kontrollmukosa und -Submukosa gegeben. Es wurden 20 Schnitte von zehn Polypen und Schnitte von tumorfreiem Kontrolldarmgewebe von 20 Patienten verwendet. Abkürzung: n.s., nicht signifikant

Abbildung 4. Die Quantifizierung der Dichte der Nervenfasern in adenomatösen Darmpolypen und in tumorfreiem Kontrollgewebe.

Die Mukosa des Polypen präsentierte sich fast frei von der noradrenergen Innervation (Abb. 4A). Der Vergleich mit dem tumorfreien Darmgewebe zeigte, dass die noradrenerge Innervation in Kontrollmukosa und Kontrollsubmukosa signifikant höher lag als im vergleichbaren Gewebe des Polypen (Abb. 4A).

In tumorfreiem Kontrollgewebe war die noradrenerge Innervation der Submukosa auch höher im Vergleich zur Mukosa (Abb. 4A). Das bedeutet, dass die Submukosa besser innerviert ist als die Mukosa und dass das tumorfreie Darmgewebe viel stärker innerviert ist als das Gewebe des Polypen.

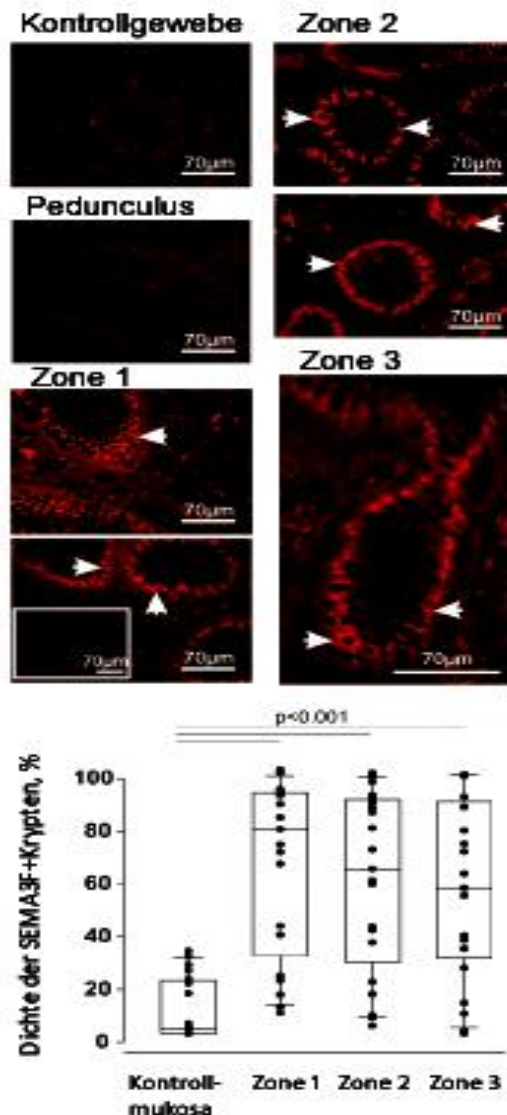
Die quantitative Auswertung der Dichte von SP+ sensiblen Nervenfasern zeigte eine etwas höhere Dichte im Pedunculus im Vergleich zur Mukosainnervation des Polypen, dieser Unterschied erreichte aber nicht das Signifikanzniveau (Abb. 4B). Ähnlich wie bei den noradrenergen Nervenfasern war die Dichte viel höher in der tumorfreien Mukosa des Kontrollgewebes verglichen mit Zonen 1 bis 3 der Polypen (Abb. 4B). Es wurde kein signifikanter Unterschied bei der Innervation der tumorfreien Kontrollen in Submukosa und Mukosa im Vergleich zur Innervation von Pedunculus (Submukosa) und Mukosa der Polypen (Zone 1-3) beobachtet (Abb.4B).

Im direkten Vergleich der noradrenergen und SP+ sensiblen Nervenfaserdichte, stellte sich heraus, dass die noradrenergen Nervenfasern deutlich prominenter vertreten waren als SP+ Nervenfasern (Abb. 4A, in dem Pedunculus des Polypen,  $p < 0,001$ ; in tumorfreier Kontrollsubmukosa,  $p < 0,001$ ). Allerdings war die Dichte der noradrenergen und sensiblen Nervenfasern in der Mukosa des Polypen und in der tumorfreien Kontrollmukosa (Abb. 4A versus 4B; nicht signifikant) ähnlich. Dies deutet darauf hin, dass es dort eine Dominanz der noradrenergen über sensiblen Nervenfasern nur in submukösen Bereichen, aber nicht in der Mukosa gibt.

### **1.3.b Expression von Semaphorine 3F und 3A in tumorfreiem Kontrollgewebe und in Polypen**

Der deutliche Verlust der noradrenergen Innervation in der Mukosa der Polypen veranlasste uns, die Präsenz von Axonlenkungsmolekülen, welche spezifisch für die Repulsion der sympathischen Nervenfasern sind, zu studieren [40]. Es stellte sich heraus, dass viele Epithelzellen in Krypten der Polypen eine sehr

intensive zytoplasmatische SEMA3F+ Färbung aufwiesen (Abb. 5 oben). Die Neutralisation des Antikörpers durch die Vorinkubation mit dem Antigen bestätigte eine spezifische Färbung (Daten nicht gezeigt). Etwa 60 bis 80% aller Krypten zeigten eine positive Färbung für SEMA3F (Abb. 5 unten).



Oben: Immunfluoreszenzfärbung von SEMA3F in verschiedenen Bereichen des tumorfreien Kontrollgewebe und in Polypen. Die Tafel in der Zone 1 zeigt die Kontrollfärbung für SEMA3F mit der Neutralisation des Antikörpers durch Vorinkubation mit dem Antigen-Peptid (AG363, Millipore, Temecula, USA). Vergrößerung 200x und 400x.

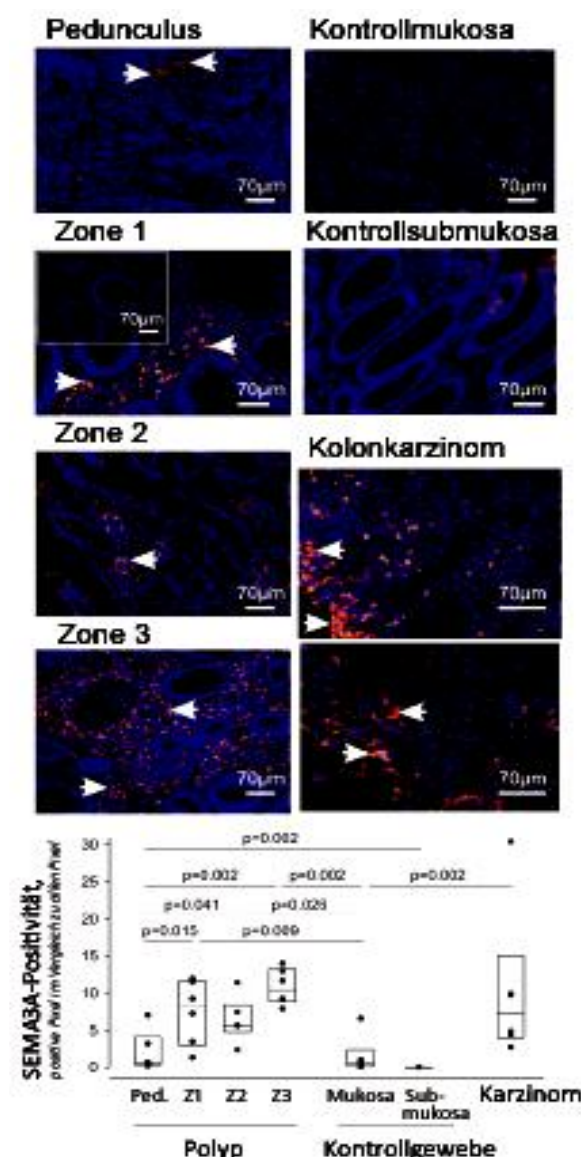
Unten: Quantifizierung von SEMA3F+ Krypten in tumorfreiem Kontrollgewebe und in Polypen. Die Zahl der positiven Krypten bezieht sich auf alle Krypten (%). In diesem Diagramm sind nur Verhältnisse in der Mukosa gegeben, weil die Submukosa keine SEMA3F+-Färbung vorweist. Es wurden zwanzig Schnitte von zehn Polypen und Schnitte von tumorfreiem Kontrolldarmgewebe von 20 Patienten verwendet.

Abbildung 5. Die Expression von Semaphorin 3F in Polypen und in tumorfreiem Kontrolldarmgewebe.

Der Vergleich der drei Zonen der Polypmukosa zeigte keinen Unterschied in der SEMA3F-Färbung (Abb. 5 unten). Im direkten Vergleich von tumorfreier Kontrollmukosa und Mukosa des Polypen wurde ein beträchtlicher Unterschied in der SEMA3F-Färbung deutlich (Abb. 5 unten). Keine Färbung war im

Pedunculus der Polypen und in tumorfreien Submukosakontrollen erkennbar (Abb.5 oben).

Weil die Dichte der sensiblen SP+ Nervenfasern in der Mukosa der Polypen deutlich niedriger war als im vergleichbaren Kontrollgewebe (Abb. 4B), haben wir die spezifischen Signalmoleküle von sensiblen Nervenfasern, SEMA3A, getestet. Wir beobachteten hier eine positive Färbung in der Submukosa des Pedunculus und in den nichtepithelialen Zellen im Gewebe zwischen den Krypten der Polypen (Abb. 6).



Die verschiedenen Zonen der Polypen sind auf der linken Seite abgebildet. Die Tafel in der Zone 1 zeigt die Kontrollfärbung für SEMA3A mit der Neutralisation des Antikörpers durch Vorinkubation mit dem Antigen-Peptid (Kat. Nr. ab88818, Abcam, Cambridge, UK).

Kolonkarzinomproben fungierten als positive Kontrollen. Vergrößerung 200x und 400x. Die blaue Färbung entspricht der Kernfärbung mit DAPI.

Unterer Teil: Quantifizierung der SEMA3A-Färbung. Die Zahl der positiven Pixel ist im Verhältnis zu allen Pixeln gegeben. Es wurden sechs Schnitte von sechs Polypen, sechs Schnitte von tumorfreiem Kontrolldarmgewebe und sechs Schnitte von Kolonkarzinomgewebe verwendet.

Abbildung 6. Die Expression von Semaphorin 3A in Polypen und in tumorfreiem Kontrolldarmgewebe.

Es gab mehr positive Färbung in der Mukosa der Polypen gegenüber dem Pedunculus (Abb. 6).

Während tumorfreie Kontrollproben aus der Submukosa nicht positiv auf SEMA3A waren, zeigten einige epitheliale Zellen im Gewebe zwischen den Krypten eine spezifische Färbung (Abb. 6). Darüber hinaus stellten sich Gewebeschnitte von kolorektalen Karzinomen auch positiv für SEMA3A dar (Abb. 6).

## 1.4 Diskussion

Diese Studie zeigte einen deutlichen Verlust vor allem der noradrenergen, aber auch sensiblen SP+ Nervenfasern in den benignen adenomatösen Polypen des Dickdarms. Dies ging einher mit einer enormen Hochregulation von Axonlenkungsmolekülen sowohl für noradrenerge, als auch für sensible periphere Nervenfasern.

Darüber hinaus färbten sich Cluster von Zellen SP+, was andeutet, dass die erhöhte Konzentration der SP wahrscheinlich unabhängig von der Anwesenheit von SP+ Nervenfasern ist.

Ein vermeintliches Übergewicht der SP über Noradrenalin stellt ein wachstumsförderndes Signal dar. Die SP wirkt pro-proliferativ bei dem Epithelzellwachstum und bei der Progression der epithelialen Tumore [18-20]. Zum Beispiel wurde die Expression des NK1-Rezeptors in menschlicher Darmmucosa *in vivo* gefunden, insbesondere in epithelialen Zellen [20]. Der NK1-Rezeptor wird in den humanen kolorektalen Karzinomen hochreguliert [47]. Nanomolare Konzentrationen von SP beschleunigen das Wachstum von Kolontumorzellen und die SP-Antagonisten (L-733, 060) inhibieren das Zellwachstum [19]. Ein proinflammatorischer Zytokinen-Cocktail aus IFN- $\gamma$ , TNF und IL-1 $\beta$  stimuliert die NK1-Rezeptor-Expression.

Darüber hinaus hat SP dosisabhängig eine proliferative Wirkung auf die durch Zytokine stimulierten epithelialen Zellen, welche spezifisch über Zytokin-induzierte NK1-Rezeptor-Hochregulation stattfindet [20]. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein proinflammatorischer Zustand mittels SP das Wachstum menschlicher epithelialer Kolonzellen stimulieren kann.

Ähnlich zu SP, hat Noradrenalin pro-proliferative Effekte auf epitheliale Zellen über  $\alpha$ -Adrenozeptoren [25-28]. Dies zeigt die trophische Rolle des Noradrenalins über  $\alpha$ -Adrenozeptoren (geschieht bei niedrigen Konzentrationen), während bei hohen Konzentrationen Noradrenalin eine entgegengesetzte Wirkung über  $\beta$ -Adrenozeptoren hat [29, 30]. Allerdings sind die Dichten von  $\alpha$ -oder  $\beta$ -Adrenozeptoren bei Kolonkarzinomen noch nie untersucht worden.

Die Frage, die am Anfang unserer Arbeit stand, war: „Welche Quellen für SP oder Noradrenalin gibt es in den adenomatösen Darmpolypen?“

Drei Quellen von Neurotransmittern / Neuropeptiden existieren im Gewebe:

- 1) durch Zirkulation, was aber nur sehr niedrige Konzentrationen von SP und Noradrenalin herbeischafft,
- 2) durch die peripheren Nervenfasern im Gewebe;
- 3) durch Neurotransmitter-produzierenden Zellen.

Nervenfasern und -zellen können große Mengen von den Neurotransmittern in unmittelbarer Nähe der Zellen freisetzen. Somit ist die Anwesenheit der jeweiligen Zellen- oder Nervenfasersubtypen für Synthese der Katecholamine oder SP von großer Bedeutung.

In dieser Studie beobachtet man ein Übergewicht der SP über Noradrenalin als Folge des Verlustes der noradrenergen und SP+ Nervenfasern, sowie durch das Vorkommen von SP+ Zell-Cluster.

Nur eine Studie untersuchte Nervenfasern in Darmpolypen [48]. Es wurde gezeigt, dass perivaskuläre Immunreaktivität von TH und SP in der Submukosa der kolorektalen Polypen verringert ist [48]. Darüber hinaus stellte man die Erhöhung des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP) in den Polypen fest, was als gefäßerweiternder neuraler Einfluss ausgelegt wurde [48]. Ein Milieu mit erhöhten VIP und erhöhter SP (von Zell-Cluster) und deutlich erniedrigtem Noradrenalin kann einen gefäßerweiternden Einfluss erzeugen, welcher für das Wachstum des Polypen notwendig ist.

Die Nasenpolypen könnten ein weiterer Gegenstand der Forschung in dieser Hinsicht sein, obwohl es klar festgehalten werden muss, dass bei den Nasenpolypen, ganz anders als bei den pro-neoplastischen Kolonadenomen, chronische Infektionen und Allergien die beiden wichtigsten ätiologischen Faktoren sind. Dennoch, in den Nasenpolypen wurde ein Verlust von adrenergen und cholinergen Nervenfasern nachgewiesen, mit Ausnahme der Stielregion, was darauf hindeutet, dass der autonome Beitrag zum Wachstum der Nasenpolypen nicht vorhanden war [49]. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die Dysfunktion der autonomen Innervation ein auslösender Faktor bei der Entwicklung von Nasenpolypen sein könnte. Da die Nasenpolypen

entzündlicher Natur sind, könnte die Hochregulation der Axonlenkungsmoleküle ebenfalls eine Rolle spielen.

In den beiden Studien wurde jedoch der Grund für die Veränderungen in der Nervenfaserdichte nicht untersucht, da die Axonlenkungsmoleküle nicht im Fokus der Forschung lagen [48].

Seit den Studien des proliferativen Pannusgewebes von Patienten mit rheumatoider Arthritis, des entzündeten Gewebes bei Charcot-Arthropathie und der entzündlichen Läsionen bei Patienten mit Morbus Crohn war man interessiert, das Zusammenspiel von Nervenfasern und Axonlenkungsmolekülen zu untersuchen [40, 41, 50, 51]. Unter diesen entzündlichen Zuständen besteht ein klares Übergewicht der SP+ sensiblen über die noradrenergen Nervenfasern [52]. Darüber hinaus sind im entzündeten Gewebe die Signalmoleküle der sympathischen Nervenfasern (Semaphorin 3C oder SEMA3F) hochreguliert [41, 50] und für sensible Nervenfasern (SEMA3A)- nicht nachweisbar [41].

In dieser Studie sieht man deutlich, dass dies in den adenomatösen Polypen anders ist, weil die jeweiligen Axonlenkungsmoleküle im Gewebe vorhanden und beiden Nervenfasersubtypen deutlich verringert sind. Die Gründe für die unterschiedliche Expression sind derzeit nicht bekannt.

Es ist höchst interessant, dass die beiden Semaphorine 3C und 3F für sympathische Nervenfasern in epithelialen Zellen exprimiert sind (vgl. Rfz. 40 für Semaphorin 3C), während SEMA3A in Zellen zwischen den Krypten nachgewiesen ist. Dies deutet auf eine unterschiedliche Regulation der Signalmoleküle hin.

Es stellt sich die Frage, was der Reiz für die Expression und Sekretion dieser Semaphorine ist.

Man hat vor kurzem gezeigt, dass SEMA3F durch starke zelluläre Reize wie Phorbolmyristatacetat und zu einem geringeren Teil durch TNF hochreguliert werden kann (R. H. Straub unveröffentlicht). So könnte eine mögliche Abfolge der Ereignisse aussehen: Ein luminaler proinflammatorischer Reiz (Bakterien, Viren, Stimuli der Mustererkennungsrezeptoren wie die Toll-like Rezeptoren) induziert die Expression der Semaphorine, dadurch werden noradrenerge und sensorische Nervenfasern abgestoßen, SP aus den Nervenfasern wird von SP



aus den Zellen zwischen den Krypten ersetzt und so entstandenes Übergewicht der SP über Noradrenalin wird zu einem wachstumsfördernden und gefäßerweiternden Faktor. Dies könnte zur Entwicklung eines Polypen im empfindlichen Gewebe führen. Obwohl ein solcher Ablauf hypothetisch ist, bringt er neue Ansätze für zukünftige pathophysiologische Forschung von Polypen.

Darüber hinaus muss man erwähnen, dass Semaphorine 3F und 3A nur als Dimere aktiv sind, sie werden zu Monomeren durch Pro-Protein-Konvertasen wie Furin gespalten. Deshalb, obwohl das Protein durch Immunfluoreszenz nachgewiesen war, ist seine Aktivität von der Anwesenheit von Pro-Protein-Konvertasen abhängig. Semaphorine wurden im kleinzelligen Lungenkarzinom, in Lungenadenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen, Melanomen und in den anderen malignen Neubildungen identifiziert [53-56]. Es wird immer deutlicher, dass die Semaphorine neben der Funktion der Axonlenkung auch für die regulatorischen Signale bei der Zellwanderung sorgen und an der Morphogenese des Gewebes und der Angiogenese in Tumoren beteiligt sind [57]. Es gibt Hinweise, dass einige Semaphorine das Entstehen der Tumore fördern, während andere diesen Prozess unterdrücken können. Es ist interessant, dass Semaphorine auch Marker von Tumoren darstellen, aber ihre genaue Rolle ist unbekannt. Diese zu klären, sollte der Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

## 1.5 Zusammenfassung

Die benignen adenomatösen kolorektalen Polypen gehen mit einem Verlust der noradrenergen und sensiblen Nervenfasern sowie mit einem Anstieg von SP+ Zell-Cluster hervor. Dies führt höchst wahrscheinlich zu einem Übergewicht der SP über Noradrenalin und somit zum Entstehen einer pro-proliferativen und gefäßerweiternden Umgebung. Axonlenkungsmoleküle der sympathischen (SEMA3F) und sensiblen (SEMA3A) Nervenfasern könnten eine wichtige Rolle für den fortschreitenden Verlust der Nervenfasern spielen. Ob die erhöhte Expression dieser Signalmoleküle und der folgende Verlust der Nervenfasern ein frühes Stadium der Polypentwicklung darstellt, sollte ein Schwerpunkt der weiteren Forschung werden.

## 2 Literaturverzeichnis

- 1 Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329:1977-81.
- 2 Jackman RJ, Mayo CW. The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 1951; 93:327-30.
- 3 Lieberman DA, Smith FW. Screening for colon malignancy with colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 1991; 86:946-51.
- 4 DiSario JA, Foutch PG, Mai HD, Pardy K, Manne RK. Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol* 1991; 86:941-5.
- 5 Kahi CJ, Rex DK, Imperiale TF. Screening, surveillance, and primary prevention for colorectal cancer: a review of the recent literature. *Gastroenterology* 2008; 135:380-99.
- 6 Beggs AD, Hodgson SV. The genomics of colorectal cancer: state of the art. *Curr Genomics* 2008; 9:1-10.
- 7 O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1990; 98:371-9.
- 8 Giuliani A, Caporale A, Corona M et al. Large size, villous content and distal location are associated with severe dysplasia in colorectal adenomas. *Anticancer Res* 2006; 26:3717-22.
- 9 Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985; 315:61-3.
- 10 Ziche M, Morbidelli L, Pacini M et al. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res* 1990; 40:264-78.
- 11 Felderbauer P, Bulut K, Hoeck K et al. Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts--evidence for a TGF-beta-dependent effect. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22:1475-80.
- 12 Collins SM. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: Implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 1996; 111:1683-99.

- 13 Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Progress in Neurobiology* 2004; 72:143-64.
- 14 Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Harle P, Scholmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut* 2006; 55:1640-9.
- 15 De FD, Wattchow DA, Costa M, Brookes SJ. Immunohistochemical characterization of the innervation of human colonic mesenteric and submucosal blood vessels. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20:1212-26.
- 16 Su HC, Bishop AE, Power RF, Hamada Y, Polak JM. Dual intrinsic and extrinsic origins of CGRP and NPY-immunoreactive nerves of rat gut and pancreas. *J Neurosci* 1987; 7:2674-87.
- 17 Lundberg JM, Hokfelt T, Kewenter J et al. Substance P-, VIP-, and enkephalin-like immunoreactivity in the human vagus nerve. *Gastroenterology* 1979; 77:468-71.
- 18 Gonzalez-Moles MA, Brener S, Ruiz-Avila I et al. Substance P and NK-1R expression in oral precancerous epithelium. *Oncol Rep* 2009; 22:1325-31.
- 19 Rosso M, Robles-Frias MJ, Covenas R, Salinas-Martin MV, Munoz M. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol* 2008; 29:245-54.
- 20 Goode T, O'Connor T, Hopkins A et al. Neurokinin-1 receptor (NK-1R) expression is induced in human colonic epithelial cells by proinflammatory cytokines and mediates proliferation in response to substance P. *J Cell Physiol* 2003; 197:30-41.
- 21 Gates TS, Zimmerman RP, Mantyh CR et al. Substance P and substance K receptor binding sites in the human gastrointestinal tract: localization by autoradiography. *Peptides* 1988; 9:1207-19.
- 22 Mantyh CR, Gates TS, Zimmerman RP et al. Receptor binding sites for substance P, but not substance K or neuromedin K, are expressed in high concentrations by arterioles, venules, and lymph nodules in surgical specimens obtained from patients with ulcerative colitis and Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:3235-9.
- 23 Valet P, Senard JM, Devedjian JC et al. Characterization and distribution of alpha 2-adrenergic receptors in the human intestinal mucosa. *J Clin Invest* 1993; 91:2049-57.

- 24 Zhang XH, Ji T, Guo H et al. Expression and activation of beta-adrenoceptors in the colorectal mucosa of rat and human. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22:e325-e334.
- 25 Chan C, Lin HJ, Lin J. Stress-associated hormone, norepinephrine, increases proliferation and IL-6 levels of human pancreatic duct epithelial cells and can be inhibited by the dietary agent, sulforaphane. *Int J Oncol* 2008; 33:415-9.
- 26 Vazquez SM, Mladovan AG, Perez C et al. Human breast cell lines exhibit functional alpha2-adrenoceptors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58:50-61.
- 27 Marinese D, Patel R, Walden PD. Mechanistic investigation of the adrenergic induction of ventral prostate hyperplasia in mice. *Prostate* 2003; 54:230-7.
- 28 Murphy CJ, Campbell S, raki-Sasaki K, Marfurt CF. Effect of norepinephrine on proliferation, migration, and adhesion of SV-40 transformed human corneal epithelial cells. *Cornea* 1998; 17:529-36.
- 29 Pullar CE, Zhao M, Song B et al. Beta-adrenergic receptor agonists delay while antagonists accelerate epithelial wound healing: evidence of an endogenous adrenergic network within the corneal epithelium. *J Cell Physiol* 2007; 211:261-72.
- 30 Pullar CE, Rizzo A, Isseroff RR. beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem* 2006; 281:21225-35.
- 31 Westfall TC, Westfall DP. Adrenergic agonists and antagonists. In: Brunton LL, Chabner B, Knollman B (eds.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 2011: 277-334.
- 32 Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience* 2001; 24:677-736.
- 33 Thoenen H. Neurotrophins and Neuronal Plasticity. *Science* 1995; 270:593-8.
- 34 Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993; 75:1389-99.

- 35 He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90:739-51.
- 36 Kolodkin AL. Semaphorin-mediated neuronal growth cone guidance. *Prog Brain Res* 1998; 117:115-32.
- 37 Lin L, Lesnick TG, Maraganore DM, Isacson O. Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends Neurosci* 2009; 32:142-9.
- 38 Dickson BJ. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 2002; 298:1959-64.
- 39 Tamagnone L, Comoglio PM. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* 2000; 10:377-83.
- 40 Straub RH, Grum F, Strauch UG et al. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* 2008; 57:911-21.
- 41 Miller LE, Weidler C, Falk W et al. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1156-63.
- 42 Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L et al. Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A. *Dev Dyn* 2004; 231:839-48.
- 43 Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:289-300.
- 44 Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem* 1971; 40:465- 500.:465-500.
- 45 Dalsgaard CJ, Jernbeck J, Stains W et al. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in nerve fibers in the human skin. Relation to fibers containing substance P-, somatostatin- and vasocactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity. *Histochemistry* 1989; 91:35-8.
- 46 Alicea C, Belkowski S, Eisenstein TK, Adler MW, Rogers TJ. Inhibition of primary murine macrophage cytokine production in vitro following treatment with the kappa-opioid agonist U50,488H. *J Neuroimmunol* 1996; 64:83-90.
- 47 Reubi JC, Mazzucchelli L, Hennig I, Laissue JA. Local up-regulation of neuropeptide receptors in host blood vessels around human colorectal

- cancers. *Gastroenterology* 1996; 110:1719-26.
- 48 Chamary VL, Loizidou M, Boulos PB, Taylor I, Burnstock G. Changes in vasoconstrictor and vasodilator neurotransmitters in nerves supplying arterioles in developing colorectal polyps. *Colorectal Dis* 2006; 8:230-4.
  - 49 Hiraide F, Kakoi H. Histochemical study on innervation of glands and blood vessels in nasal polyps. *Acta Otolaryngol Suppl* 1986; 430:5-11.
  - 50 Fassold A, Falk W, Anders S et al. Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60:2892-901.
  - 51 Koeck FX, Bobrik V, Fassold A et al. Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis. *J Orthop Res* 2009; 27:736-41.
  - 52 Weidler C, Holzer C, Harbuz M et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:13- 20.
  - 53 Xiang RH, Hensel CH, Garcia DK et al. Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics* 1996; 32:39-48.
  - 54 Martin-Satue M, Blanco J. Identification of semaphorin E gene expression in metastatic human lung adenocarcinoma cells by mRNA differential display. *J Surg Oncol* 1999; 72:18-23.
  - 55 Yamada T, Endo R, Gotoh M, Hirohashi S. Identification of semaphorin E as a non-MDR drug resistance gene of human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:14713-8.
  - 56 Bielenberg DR, Hida Y, Shimizu A et al. Semaphorin 3F, a chemorepulsant for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest* 2004; 114:1260-71.
  - 57 Comoglio PM, Tamagnone L, Giordano S. Invasive growth: a two-way street for semaphoring signalling. *Nat Cell Biol* 2004; 6:1155-7

### 3 Publikation

Des Weiteren ist die bereits publizierte Originalarbeit angefügt.

Die Arbeit wurde am 16.11.2011 online bei Wiley Interscience veröffentlicht

([DOI: 10.1111/j.1365-2982.2011.01818.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01818.x))

und erschien im Februar 2012 in

**Neurogastroenterologie & Motility** (Band 24, Heft 2, Seiten 120-e83).



## Loss of sensory and noradrenergic innervation in benign colorectal adenomatous polyps – a putative role of semaphorins 3F and 3A

N. GRAF,\* M. MCLEAN,† S. CAPELLINO,\* J. SCHÖLMECH,\* G. I. MURRAY,‡ E. M. EL-OMAR† & R. H. STRAUB\*

\*Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany

†Division of Applied Medicine, School of Medicine & Dentistry, University of Aberdeen, Aberdeen, UK

‡Department of Pathology, University of Aberdeen, Aberdeen, UK

### Abstract

**Background** Nerve fibers can exert trophic/anti-trophic effects on epithelial cells. Substance P (SP) is a pro-proliferative neuropeptide, whereas sympathetic noradrenaline is anti-proliferative at high concentrations. **Methods** Density of noradrenergic and sensory nerve fibers and presence of nerve repellent factors specific for noradrenergic (semaphorin 3F) and sensory nerve fibers (semaphorin 3A) were investigated in colorectal adenomas. **Key Results** The pedunculus was innervated by noradrenergic fibers, whereas the mucosa was sparsely innervated. The control submucosa compared with control mucosa demonstrated increased density of noradrenergic fibers. Control tissue was much better innervated than the polyp. This was accompanied by strong expression of semaphorin 3F in epithelial cells. Density of sensory SP+ nerve fibers was higher in control colon mucosa compared with polyp mucosa, and SP+ cell clusters and semaphorin 3A-positive cells appeared in the intercrypt space in polyps, but not in control tissue. **Conclusions & Inferences** This study demonstrated a marked loss of noradrenergic and sensory nerve fibers in polyp mucosa, which was associated with a strong increase of semaphorin 3F and 3A. Up-regulation of the sympathetic repellent semaphorin 3F in the polyps possibly triggers sympathetic repulsion and polyp growth due to the loss of anti-proliferative noradrenaline and presence of SP from local SP+ cells.

**Keywords** adenomatous colon polyp, noradrenaline, semaphorins, sensory nervous system, substance P, sympathetic nervous system.

### INTRODUCTION

Colonic polyps can progress to colorectal adenocarcinomas, but the molecular sequence of events is still a matter of debate.<sup>1</sup> Most familial and sporadic cases arise through malignant transformation of benign adenomas in a process known as the adenoma-to-carcinoma sequence as already suggested in the 1950s.<sup>2</sup> It has been estimated that 30–40% of the westernized population develop adenomas during lifetime, but only 3% will progress to colorectal cancer.<sup>3,4</sup> Based on these findings, colorectal cancer screening programs have been adopted widely.<sup>5</sup>

Advances over the last 30 years have led to an increase in knowledge of molecular mechanisms underlying colorectal carcinogenesis.<sup>6</sup> However, considerable work is still required to clarify the precise pathways of progression from benign polyp to colorectal cancer. There are several adenoma characteristics linked to increased risk of malignant transformation, such as increased size, a greater villous component, increasing degree of epithelial cell dysplasia and multiple synchronous lesions.<sup>7,8</sup> These characteristics indicate that growth-associated features of colorectal polyps are of critical importance for malignant transformation. It is particularly the number, size, and villous component that determine the prognosis. Although the growth-promoting effects of neurotransmitters/neuropeptides are well known,<sup>9–11</sup> the role of neuronal factors in adenoma growth was not in the focus of polyp research. As substance P-positive (SP+) sensory nerve fibers and sympathetic catecholaminergic nerve fibers densely innervate the intestinal

### Address for Correspondence

Professor Rainer H. Straub, M.D., Professor of Experimental Medicine, Laboratory of Neuroendocrino-Immunology, Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, 93042 Regensburg, Germany.  
Tel: +49 941 944 7120; fax: +49 941 944 7121;  
e-mail: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de

Received: 15 September 2011

Accepted for publication: 18 October 2011



wall,<sup>12–14</sup> the two nerve fiber types might influence the development of polyps. SP+ nerve fibers can either be intrinsic enteric nerve fibers<sup>13</sup> or extrinsic sensory nerve fibers that run to the dorsal root ganglia<sup>15,16</sup> or within the Vagus nerve.<sup>17</sup>

In several studies, SP was described to play a proliferative role in epithelial cell growth and epithelial tumor progression.<sup>18–20</sup> The trophic role of SP is conveyed by the neurokinin 1 (NK1) receptor.<sup>18–20</sup> SP receptors have been identified in colonic mucosa<sup>21</sup> and they can be upregulated in the context of tissue inflammation.<sup>22</sup> Similarly, alpha- and beta-adrenoceptors have been identified in colonic mucosa.<sup>23,24</sup> Noradrenaline induces pro-proliferative responses on epithelial cells mainly via alpha-adrenoceptors.<sup>25–28</sup> Although this clearly indicates the trophic role of noradrenaline via alpha-adrenoceptors, it has been demonstrated that noradrenaline can exert opposite effects via beta-adrenoceptors.<sup>29,30</sup> The dichotomous effects of noradrenaline depends on the different G-protein-coupled adrenoceptors with opposite effects on the cAMP/protein kinase A/CREB pathway. As noradrenaline binds with higher affinity to alpha-adrenoceptors (inducing low cAMP levels and switching-on protein kinase C),<sup>31</sup> low concentrations of noradrenaline are growth-promoting, whereas high levels inhibit epithelial cell growth (high cAMP). In addition, SP is vasodilatory, which is important for maintaining adequate nutritional support for the growing tissue. Thus, the presence of the respective nerve fiber subtypes, whether sympathetic noradrenaline-positive or sensory SP-positive, is of importance for neurotransmitter concentration and effects on growth of epithelial tissue. A preponderance of SP over noradrenaline would support the development of adenomatous polyp tissue. The question remains of how the presence of nerve fibers in the polyp is regulated.

The regulation of nerve fiber growth (nerve growth factors) and guidance (nerve repellent factors such as semaphorins), which determine nerve fiber density, was part of neuroscience research during the last decades.<sup>32–37</sup> Although nerve growth factors are usually unspecific for the different nerve fiber types, nerve repellent factors are specific. Recently, nerve repellent factors attracted much attention because they specifically determine tissue density of peripheral nerve fibers.<sup>32–37</sup> An important group of repellent factors are the semaphorins with their receptors, neuropilins, and plexins which specifically repel noradrenergic and sensory nerve fibers.<sup>38,39</sup> It was suggested that these repellent factors play a role in intestinal inflammation.<sup>40</sup> Although semaphorin 3F is a repellent of sympathetic nerve fibers, semaphorin 3A repels

SP-positive sensory nerve fibers. The differential expression of the semaphorins determines the density of the two nerve fiber types in peripheral tissue.<sup>40–42</sup> Furthermore, expression of semaphorins and their receptors have been linked to the development of intestinal epithelial tumors and metastasis, but the exact meaning of these neuronal guidance factors for tumor progression at present, remains unknown.<sup>43</sup> From this point of view, density of peripheral nerve fibers should always be studied together with expression of specific semaphorins.

This study aimed to investigate the density of noradrenergic tyrosine-hydroxylase - positive and sensory SP+ nerve fibers in benign adenomatous polyps of the colon. The investigation of these nerve fiber types was studied together with the expression of the nerve repellent factors semaphorin 3F (sympathetic) and semaphorin 3A (sensory). The findings in the polyps were compared with data of mucosa and submucosa of control colon tissue.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissue specimens

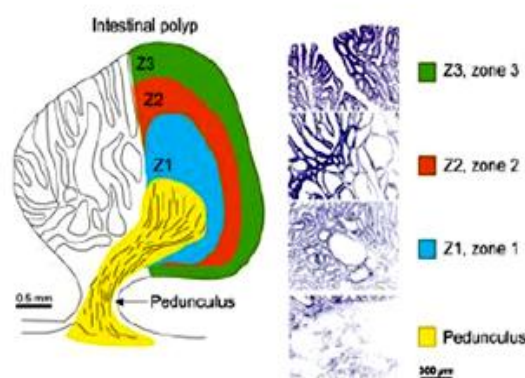
A total of 10 tubular colorectal adenomatous polyps were removed and subjected to a detailed histologic analysis without further selection. The polyps were obtained during screening colonoscopy from patients attending the Gastrointestinal Unit in the University Hospital in Aberdeen, U.K. Control samples were obtained from patients undergoing gastrointestinal surgery for colon carcinoma at the University Hospital in Regensburg. Control samples were located in a tumor-remote area that was free of tumor infiltration as tested by routine histopathology in our Institute of Pathology (at least 10 cm away from the tumor). From the same tumor tissue, samples of colorectal carcinoma were obtained. Ethical approval for this study was obtained from the Ethics Committees at the two investigational sites.

Specimens were sent to the Department of Pathology for routine diagnostic purposes in fixation solution (4% neutral buffered formalin). Each specimen was evaluated for confirmation of histologic diagnosis, including degree of epithelial dysplasia, by an experienced consultant pathologist (G.I.M.). The macroscopic size of each polyp was measured formally as part of the pathological analysis post fixation and before embedding. The 10 included polyp specimens were low-grade dysplasia tubular adenomas with a size of approximately 3–8 mm. Of each specimen, a total of 10 tissue sections were available for the analyses. The control samples used for this study were histologically tumor-free and without signs of inflammation. These samples were paraffin embedded, and 4  $\mu$ m-sections were cut and placed onto 3-aminopropyltriethoxysilane-coated slides for subsequent immunofluorescent analysis.

### Histologic investigation and immunofluorescent analyses of nerve fibers

Adenomatous polyps were studied using four different micro-anatomical zones (Fig. 1). The pedunculus zone was clearly





**Figure 1** Zonal analysis of adenomatous colon polyps. The pedunculus zone was clearly separated from the mucosal zones by aspects typical for submucosa and muscularis mucosae. The mucosal zones were separated into three equally sized thirds [Z3 = outer third, Z2 = middle third, and Z1 = inner third] to estimate nerve fiber density as a function of the distance to the pedunculus. The histologic hematoxylin stained tissue demonstrates examples of every zone. Magnification 50 $\times$ . The calibration bar of 300  $\mu$ m is relevant for all hematoxylin stained tissue micrographs.

separated from the mucosal zones by typical aspects of the submucosa and the border of the Muscularis mucosae. The mucosal zones were separated into three equally sized thirds (outer third, middle third, and inner third) to estimate nerve fiber density as a function of the distance to the submucosa of the pedunculus. Typical histologic aspects of the four different zones are demonstrated in Fig. 1.

For determination of polyp innervation, immunofluorescence was carried out with primary antibodies against tyrosine-hydroxylase (TH, the key enzyme for noradrenaline production in noradrenergic nerve endings;<sup>44</sup> rabbit polyclonal antibody, cat. no. AB152, Chemicon, Temecula, CA, USA); and against SP (the key neuropeptide of sensory nerve fibers;<sup>45</sup> mouse monoclonal antibody, cat. no. MAB4375, R&D Wiesbaden, Germany). Sections were incubated with these antibodies for 12–18 h at room temperature. Specific Alexa 546 conjugated secondary antibodies (cat. no. A-11010 against rabbit IgG, and cat. no. A-11030 against mouse IgG, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) were used to achieve immunofluorescent staining of noradrenergic and SP+ nerve fibers. Antigen retrieval was required for TH staining using a 30 min heating period in pH 9.0 buffer. In the different zones, the numbers of TH+ noradrenergic and SP+ single nerve fibers per square millimeter were determined by averaging the number of stained nerve fibers (minimum length 50  $\mu$ m, determined through a micrometer eyepiece) in 17 randomly selected high power fields of view (400 $\times$ ). We controlled the positive nerve fiber staining by incubating the tissue with isotype control antibodies that always yielded a negative staining. In our hands, for single nerve fiber determination, automatic or semiautomatic image analysis is not feasible.

In some instances, the nuclei in the tissue were counter-stained by 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, Munich, Germany).

### Immunofluorescence of Semaphorin 3F and 3A

De-paraffinized sections were incubated with polyclonal SEMA3F and polyclonal SEMA3A antibodies for 12–18 h at room

temperature (SEMA3F: cat. no. AB5471P, Millipore, Temecula, USA; SEMA3A: cat. no. ab23393, Abcam, Cambridge, UK). The antibody to SEMA3F is directed only to the long form of this protein, but as long and short forms exist *in vivo* in parallel, the demonstrated expression pattern might have been influenced by this fact. Antigen retrieval was required using a 30 min heating period in pH 9.0 buffer. Secondary staining was achieved with an Alexa 546 conjugated secondary antibody (cat. no. A-11010 against rabbit IgG, Molecular Probes). Negative control staining was carried out by neutralizing the primary antibody with the immunizing antigen (SEMA3F: cat. no. AG363, Millipore, Temecula, USA; SEMA3A: cat. no. ab88818, Abcam, Cambridge, UK), which always yielded a negative result [see inserts in figures of SEMA3F and SEMA3A staining below]. Positive control staining to optimize staining was carried out earlier using cancer cell lines (semaphorin 3A: MDA-MB-231; semaphorin 3F: PC3M and 253J). In some instances, the nuclei in the tissue were counter-stained by 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, Munich, Germany).

In this analysis, we found that epithelial cells were the main visible source of SEMA3F (see Results). Thus, we used the following method to quantitate epithelial cells of crypts positive for SEMA3F. If epithelial cells of two-thirds of the circumference of a horizontally cut crypt stained positive for SEMA3F, the crypt was defined to be SEMA3F-positive. If epithelial cells, of the entire U-shaped basis of a longitudinally cut crypt stained positive for SEMA3F, the crypt was defined to be positive. We used 17 randomly selected high power fields of view (400 $\times$ ) in each zone given in Fig. 1 to calculate the positive horizontally and longitudinally cut crypts in relation to all crypts (unit: percent of all crypts). The number 17 was derived from an extensive quantitative histology study.<sup>46</sup>

Detection of SEMA3A – positive cells was performed in a qualitative manner without exact counting of cells.

### Presentation of data and statistical analysis

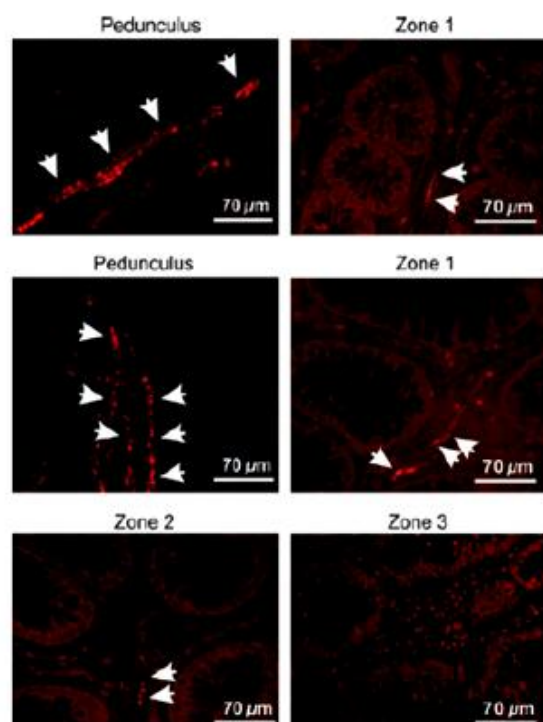
Data in figures are given as box plots (Sigma Plot, V.12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, a line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Two independent groups were compared using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test (SPSS). Dependent data (comparison of zones with each other, comparison of density of different nerve fibers in the same area) were compared using the non-parametric Wilcoxon signed-rank test with paired data (SPSS) and significance level was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Sensory and noradrenergic innervation of the polyp

The pedunculus of the polyp was densely innervated by noradrenergic nerve fibers, which were not only located in the proximity of vessels but also in the area between the vasculature. Entire bundles of bead chain-like noradrenergic nerve fibers were detected in the pedunculus (Fig. 2). There was a marked reduction of density of noradrenergic nerve fibers beyond the



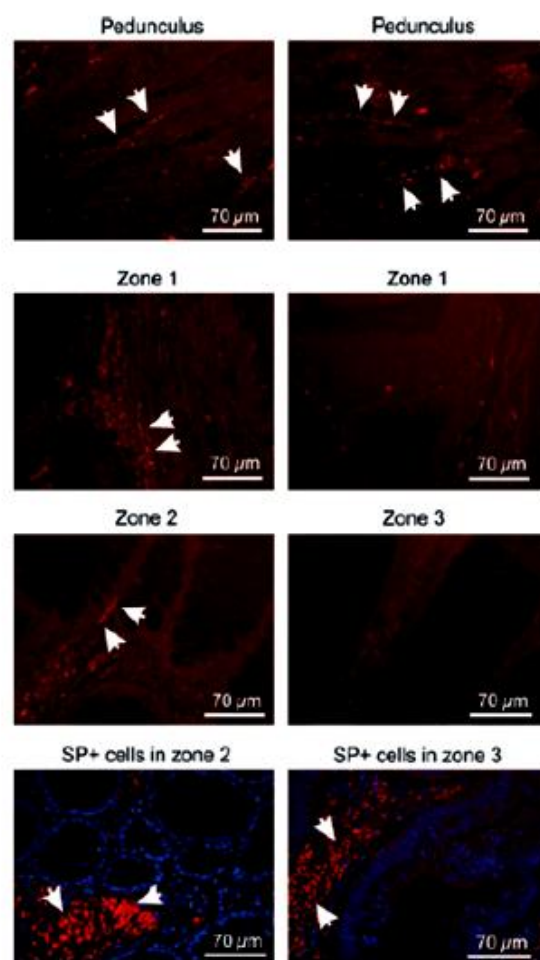


**Figure 2** Noradrenergic innervation of adenomatous colon polyps. The bead chain-like structure of noradrenergic nerves is visible as nerve bundle and single small fibers. In zone 1–3, noradrenergic nerve fibers are rare in the intercrypt space. No noradrenergic nerve fibers were discovered within the epithelial cell layer. Magnification 400 $\times$ .

Muscularis mucosae (compare pedunculus with zone 1 in Fig. 2). Noradrenergic innervation gradually decreased from zone 1 to zone 3 (Fig. 2). In the intercrypt space, very few cells stained positive for tyrosine-hydroxylase.

As with noradrenergic nerve fibers, sensory SP+ nerve fibers were most abundant in the pedunculus (Fig. 3). While SP+ innervation was very low in zone 1 and zone 2, zone 3 was devoid of sensory innervation (Fig. 3). In the intercrypt space, cells stained positive for SP, which sometimes demonstrated a follicle-like structure (Fig. 3, bottom). This implies that concentration of SP can be highly independent of the presence of SP+ sensory nerve fibers.

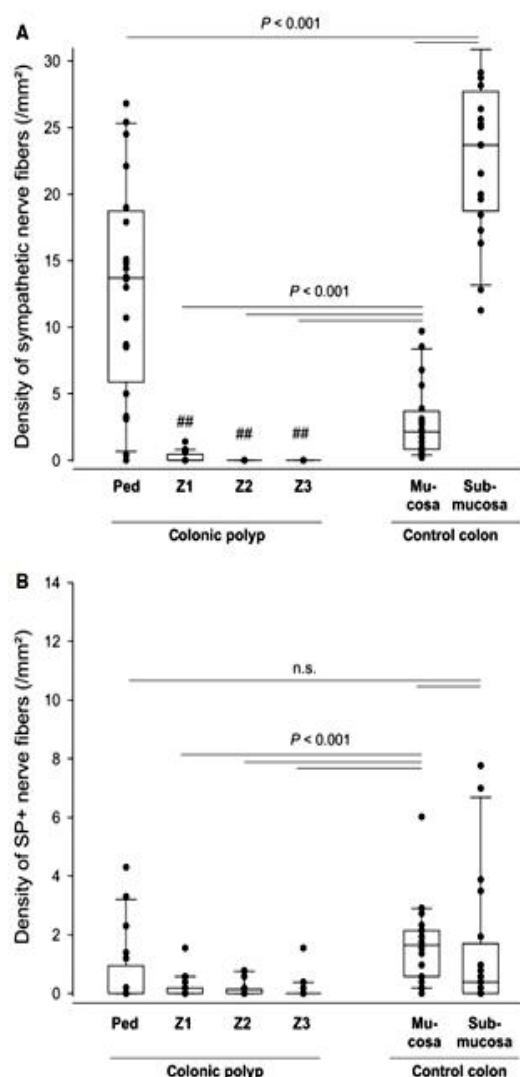
Quantitative evaluation of noradrenergic nerve fiber density demonstrated a clear difference between pedunculus and mucosa (Fig. 4A). The mucosa in the polyp was nearly devoid of noradrenergic innervation (Fig. 4A). The comparison with tumor-free control colonic tissue demonstrated that noradrenergic innervation in control mucosa and submucosa was significantly higher when compared with polyp tissue



**Figure 3** Sensory innervation of adenomatous colon polyps. In the pedunculus, the bead chain-like structure of substance P - positive nerve fibers is visible. In zone 1 and 2, sensory nerve fibers are rare in the intercrypt space, whereas no fibers were detected in zone 3. No sensory nerve fibers were discovered within the epithelial cell layer. Magnification 400 $\times$ . The blue staining in the figure reflects nuclear staining with DAPI.

(Fig. 4A). In tumor-free control colon tissue, noradrenergic innervation of submucosa was also increased compared with mucosal sites (Fig. 4A). This indicates that the submucosa is better innervated than the mucosa and that tumor-free control colon tissue is much better innervated than polyp tissue.

Quantitative evaluation of SP+ sensory nerve fibers demonstrated a somewhat higher density of the pedunculus compared with mucosal innervation of the polyp, but this did not reach the significance level (Fig. 4B). Similarly, as with noradrenergic nerve fibers, the density was much higher in tumor-free control colon mucosa when compared with polyp zones 1–3



**Figure 4** Quantitation of nerve fiber density in adenomatous colon polyps and tumor-free control tissue. (A) Density of noradrenergic nerve fibers in the pedunculus (Ped) and the three mucosal zones (Z1–Z3). For comparison, density of nerve fibers in tumor-free control mucosa and submucosa are given. Twenty slices of 10 polyps and slices of tumor-free control colon tissue of 20 patients were used. <sup>##</sup> $P < 0.001$  vs Ped. (B) Density of substance P-positive (SP+) nerve fibers in the pedunculus and the three mucosal zones. For comparison, density of nerve fibers in tumor-free control mucosa and submucosa are given. Twenty slices of 10 polyps and slices of tumor-free control colon tissue of 20 patients were used. Abbreviation: n.s., not significant.

(Fig. 4B). No significant difference was observed for tumor-free control submucosa and mucosa and polyp pedunculus (submucosa) and polyp mucosa (zone 1–3) (Fig. 4B).

In the direct comparison of noradrenergic and SP+ sensory nerve fiber density, it turned out that noradrenergic nerve fibers were markedly more prominent when

compared with SP+ nerve fibers (Fig. 4A, in the polyp pedunculus,  $P < 0.001$ ; in tumor-free control submucosa,  $P < 0.001$ ). However, the density of noradrenergic and sensory nerve fibers was similar in the polyp mucosa and in tumor-free control mucosa (Fig. 4A vs B, not significant). This indicates that there is a predominance of noradrenergic over sensory nerve fibers only in submucosal areas, but not at mucosal sites.

### Expression of Semaphorins 3F and 3A in tumor-free control colon and in the polyp

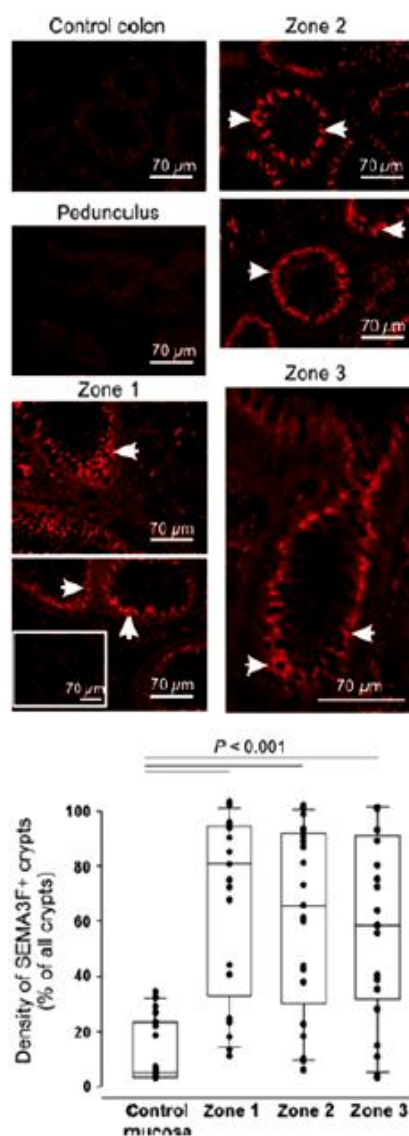
The marked loss of noradrenergic innervation in polyp mucosa prompted us to study the presence of nerve repellent factors that are specific for sympathetic nerve fiber repulsion.<sup>40</sup> It turned out that many epithelial cells in polyp crypts stained positive for semaphorin 3F (Fig. 5 upper part). The staining was very intense in the cytoplasm and neutralization of the antibody with the immunizing peptide demonstrated specific staining (data not shown). Approximately 60–80% of all crypts stained positive for semaphorin 3F (Fig. 5 lower part). The comparison of the three mucosal zones did not reveal a difference in semaphorin 3F staining (Fig. 5 lower part). In the direct comparison of tumor-free control mucosa and polyp mucosa, a marked difference in semaphorin 3F staining was observed (Fig. 5 lower part). No staining was observed in polyp pedunculus and tumor-free control submucosa (Fig. 5 upper part).

As density of sensory SP+ nerve fibers was markedly lower in polyp mucosa compared with tumor-free control mucosa (Fig. 4B), the specific repellent factor of sensory nerve fibers, semaphorin 3A, was also tested. We observed positive staining in the submucosa of the pedunculus and of non-epithelial cells in the intercrypt polyp area (Fig. 6). There was more positive staining in the mucosal zones of the polyp compared with the pedunculus (Fig. 6). While tumor-free control submucosa did not stain positive for semaphorin 3A, some epithelial cells of the intercrypt surface layer of tumor-free control mucosa showed specific staining (Fig. 6). In addition, tissue of colorectal carcinoma also stained positive for semaphorin 3A (Fig. 6).

### DISCUSSION

This study demonstrated a marked loss of not only noradrenergic but also sensory SP+ nerve fibers in benign adenomatous polyps of the colon. This was accompanied by a huge up-regulation of nerve repellent factors for both noradrenergic and sensory peripheral nerve fibers. In addition, clusters of cells stained positive for SP, which indicates that SP concentrations





**Figure 5** Expression of semaphorin 3F in polyp tissue and tumor-free control colonic tissue. Upper part: Immunofluorescence of semaphorin 3F in different areas of tumor-free control and polyp tissue. The insert in the zone 1 panel demonstrates antigenic peptide-neutralized control of semaphorin 3F staining using the original antigenic peptide (AG363, Millipore, Temecula, CA, USA). Magnification 200 $\times$  and 400 $\times$ . Lower part: quantitation of semaphorin 3F – positive crypts in tumor-free control and polyp tissue. The number of positive crypts is given relative to all detectable crypts. In this graph, only the mucosal sites are given because the submucosa did not stain positive for semaphorin 3F. Twenty slices of 10 polyps and slices of tumor-free control colon tissue of 20 patients were used.

are probably elevated independent of the presence of SP+ nerve fibers. A putative preponderance of SP over noradrenaline is a growth-promoting signal.

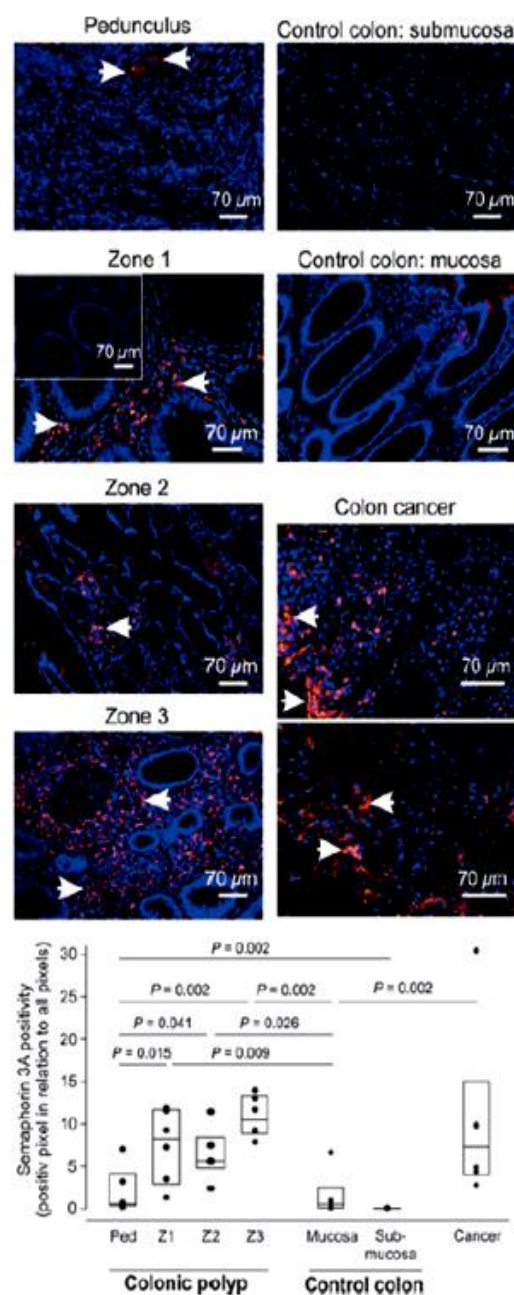
SP is pro-proliferative for epithelial cell growth and epithelial tumor progression.<sup>18–20</sup> For example, the expression of the NK1 receptor expression was found in the human colonic mucosa *in vivo*, particularly in epithelial cells.<sup>20</sup> The NK1 receptor is upregulated in human colorectal cancers.<sup>47</sup> Nanomolar concentrations of SP increased growth of colonic tumor cells and the SP antagonist L-733,060 inhibited cell growth.<sup>19</sup> Stimulation with a proinflammatory cytokine cocktail containing IFN-gamma, TNF, and IL-1beta, stimulated NK1 receptor expression. In addition, SP elicited a dose-dependent proliferative effect on cytokine-stimulated epithelial cells, which was mediated specifically via cytokine-induced NK1 receptor up-regulation.<sup>20</sup> These results demonstrate that a proinflammatory situation can stimulate growth of human colonic epithelial cells by SP.

Similar to SP, noradrenaline has pro-proliferative effects on epithelial cells via alpha-adrenoceptors.<sup>25–28</sup> This indicates the trophic role of noradrenaline via alpha-adrenoceptors (happens at low concentrations), whereas noradrenaline has opposite effects at high concentrations via beta-adrenoceptors.<sup>29,30</sup> However, densities of  $\alpha$ - or  $\beta$ -adrenoceptors have never been investigated in colon cancer. The question appears as to which source is available for SP or noradrenaline in adenomatous colon polyps which was the starting point of our work.

Three sources of neurotransmitters/neuropeptides exist in the tissue: (i) Through circulation, but this only yields very low concentration of SP and noradrenaline; (ii) through peripheral nerve fibers in the tissue; and (iii) through neurotransmitter-producing cells. Nerve fibers and cells can produce large amounts of neurotransmitters released into the direct vicinity of the cell. Thus, the presence of the respective nerve fiber subtypes or cells expressing the synthesis machinery for catecholamine or SP are of importance. In this study, we observed a preponderance of SP over noradrenaline as a consequence of the loss of noradrenergic and SP+ nerve fibers, but the appearance of SP+ cell clusters.

Only one study addressed nerve fibers in colon polyps.<sup>48</sup> It was demonstrated that perivascular immunoreactivity for tyrosine-hydroxylase and SP in the submucosa was decreased in colorectal polyps.<sup>48</sup> In addition, staining of vasoactive intestinal peptide (VIP) was increased in the polyp, which was interpreted as a vasodilatory neural influence.<sup>48</sup> We agree that a milieu with more VIP and SP (from cell clusters) and markedly less noradrenaline can generate a vasodilatory environment necessary to support polyp growth. Nasal polyps might be another object of investigation in this respect,





**Figure 6** Expression of semaphorin 3A in polyp tissue and tumor-free control colonic tissue. The different areas of polyp tissue are given on the left side. The insert in the zone 1 panel demonstrates antigenic peptide-neutralized control of semaphorin 3A staining using the original antigenic peptide [cat. no. ab88818, Abcam, Cambridge, UK]. Colon cancer specimens were used as positive controls. Magnification 200 and 400 $\times$ . The blue staining in the figure reflects nuclear staining with DAPI. Lower part: quantitation of semaphorin 3A – positivity. The number of positive pixels is given relative to all pixels. Six slices of six polyps, six slices of tumor-free control colon tissue, and six slices of cancer tissue were used.

although it must be clearly stated that nasal polyps are quite different from colon adenoma because chronic infection and allergy are considered to be the two major etiologic factors, which is quite different from pre-neoplastic colon adenoma. Nevertheless, in nasal polyps, a loss of adrenergic and cholinergic nerve fibers was demonstrated, except in the stalk region, suggesting that the autonomic input was not present in nasal polyps.<sup>49</sup> These authors hypothesized that dysfunction of autonomic innervation may be a causative factor in the development of nasal polyps. As nasal polyps are inflammatory in nature, upregulation of nerve repellent factors might also play a role. In both studies, however, a reason for the changes in nerve fiber density was not investigated because nerve repellent factors were not in the focus of the research.<sup>48</sup>

We were interested in the interplay of nerve fibers and nerve repellent factors because our earlier studies were in the proliferative pannus tissue of patients with rheumatoid arthritis, inflamed tissue of Charcot arthropathy, and inflammatory lesions in Crohn's patients.<sup>40,41,50,51</sup> Under these inflammatory conditions, a situation exists with a clear preponderance of SP+ sensory over noradrenergic nerve fibers.<sup>52</sup> In addition, sympathetic nerve repellent factors, semaphorin 3C or semaphorin 3F, are up-regulated in inflamed tissue.<sup>41,50</sup> However, the sensory nerve repellent semaphorin 3A was not detectable.<sup>41</sup> In this study, we showed that this is different in the adenomatous polyp because both nerve repellent factors appearing in the tissue and both nerve fiber subtypes are markedly decreased. The reasons for the differential expression presently remain unknown. It is highly interesting that the two semaphorins 3C/3F for sympathetic nerve fibers are expressed in epithelial cells (see ref.<sup>40</sup> for semaphorin 3C), whereas semaphorin 3A is expressed in cells of the intercrypt space. This indicates a differential regulation of the two nerve repellent factors. The question appears as to what is the stimulus for expression and secretion of semaphorins.

We recently demonstrated that semaphorin 3F can be up-regulated by strong cellular stimuli such as phorbol myristate acetate and to a minor extent by TNF (R. H. Straub unpublished). Thus, a possible sequence of events might be as follows: A luminal proinflammatory stimulus (bacteria, virus, and pattern recognition receptor stimulus such as the toll-like receptors) induces expression of semaphorins, noradrenergic and sensory nerve fibers get repelled, SP from nerve fibers is replaced by SP from intercrypt cells, and a preponderance of SP over noradrenaline is a growth-promoting and vasodilatory factor. This might lead to the development of a polyp in susceptible tissue.



Although this sequence is hypothetical, it might give new ideas for future pathophysiology research of polyps. In addition, we need to mention that semaphorin 3F and 3A are only active as dimers and are cleaved to monomers by pro-protein convertases such as furin. Therefore, even though the protein is detected by immunofluorescence, proteins might be active or inactive depending on the presence of pro-protein convertases.

Semaphorins have been identified in small cell lung cancer, lung adenocarcinomas, squamous cell carcinomas, melanoma, and others.<sup>53–56</sup> Beside the axon guidance function, growing evidence suggests that semaphorins provide regulatory signals for cell migration, tissue morphogenesis, and angiogenesis in the tumor.<sup>57</sup> Some semaphorins have been proposed to have pro-tumoral properties, whereas others have been shown to have tumor suppressive activity. It is interesting that semaphorins are markers of tumors, but their exact role remains unknown. However, we have not studied these other important functions of semaphorins in polyp tissue, but this should be a subject of future research.

In conclusion, the adenomatous polyp is characterized by a loss of noradrenergic and sensory nerve fibers, and an increase of SP+ cell clusters. This most probably leads to a preponderance of SP over noradrenaline and

thus, to a pro-proliferative and vasodilatory environment. Nerve repellent factors of sympathetic and sensory nerve fibers might play an important propagating role for nerve fiber loss. Whether expression of these repellent factors and subsequent loss of nerve fibers is an early event and contributes to polyp development should become focus of further research.

## ACKNOWLEDGEMENTS

There was no financial support other than the support of the involved institutions.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest and there are no potential competing interests.

## AUTHOR CONTRIBUTION

NG carried out data generation, generating figures, revising the draft, final approval; MMCL discussed the contents and figures, revised the draft, and provided final approval; SC performed data generation, revising the draft, and final approval; JS revised the draft, and provided final approval; GIM discussed the contents, revised the draft, and gave final approval; EMEIO discussed the contents and figures, revised the draft, and provided final approval; RHS generated the hypothesis, developed the new theory, drafted the paper, generated figures, and gave final approval.

## REFERENCES

- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN *et al.* Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; **329**: 1977–81.
- Jackman RJ, Mayo CW. The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 1951; **93**: 327–30.
- Lieberman DA, Smith FW. Screening for colon malignancy with colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 1991; **86**: 946–51.
- DiSario JA, Foutch PG, Mai HD, Pardy K, Manne RK. Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol* 1991; **86**: 941–5.
- Kahi CJ, Rex DK, Imperiale TF. Screening, surveillance, and primary prevention for colorectal cancer: a review of the recent literature. *Gastroenterology* 2008; **135**: 380–99.
- Beggs AD, Hodgson SV. The genomics of colorectal cancer: state of the art. *Curr Genomics* 2008; **9**: 1–10.
- O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG *et al.* The National Polyp Study Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1990; **98**: 371–9.
- Giuliani A, Caporale A, Corona M *et al.* Large size, villous content and distal location are associated with severe dysplasia in colorectal adenomas. *Anticancer Res* 2006; **26**: 3717–22.
- Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985; **315**: 61–3.
- Ziche M, Morbidelli L, Pacini M *et al.* Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res* 1990; **40**: 264–78.
- Felderbauer P, Bulut K, Hoeck K *et al.* Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts – evidence for a TGF-beta-dependent effect. *Int J Colorectal Dis* 2007; **22**: 1475–80.
- Collins SM. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 1996; **111**: 1683–99.
- Fumess JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 2004; **72**: 143–64.
- Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Harle P, Scholmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut* 2006; **55**: 1640–9.
- De FD, Wattchow DA, Costa M, Brookes SJ. Immunohistochemical characterization of the innervation of human colonic mesenteric and submucosal blood vessels. *Neurogastroenterol Motil* 2008; **20**: 1212–26.
- Su HC, Bishop AE, Power RF, Hamada Y, Polak JM. Dual intrinsic and extrinsic origins of CGRP- and NPY-immunoreactive nerves of rat gut and pancreas. *J Neurosci* 1987; **7**: 2674–87.
- Lundberg JM, Hokfelt T, Kewenter J *et al.* Substance P-, VIP-, and enkephalin-like immunoreactivity in the human vagus nerve. *Gastroenterology* 1979; **77**: 468–71.



- 18 Gonzalez-Moles MA, Brener S, Ruiz-Avila I et al. Substance P and NK-1R expression in oral precancerous epithelium. *Oncol Rep* 2009; **22**: 1325–31.
- 19 Rosso M, Robles-Frias MJ, Covenas R, Salinas-Martin MV, Munoz M. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol* 2008; **29**: 245–54.
- 20 Goode T, O'Connor T, Hopkins A et al. Neurokinin-1 receptor [NK-1R] expression is induced in human colonic epithelial cells by proinflammatory cytokines and mediates proliferation in response to substance P. *J Cell Physiol* 2003; **197**: 30–41.
- 21 Gates TS, Zimmerman RP, Mantyh CR et al. Substance P and substance K receptor binding sites in the human gastrointestinal tract: localization by autoradiography. *Peptides* 1988; **9**: 1207–19.
- 22 Mantyh CR, Gates TS, Zimmerman RP et al. Receptor binding sites for substance P, but not substance K or neuromedin K, are expressed in high concentrations by arterioles, venules, and lymph nodules in surgical specimens obtained from patients with ulcerative colitis and Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3235–9.
- 23 Valet P, Senard JM, Devedjian JC et al. Characterization and distribution of alpha 2-adrenergic receptors in the human intestinal mucosa. *J Clin Invest* 1993; **91**: 2049–57.
- 24 Zhang XH, Ji T, Guo H et al. Expression and activation of beta-adrenoceptors in the colorectal mucosa of rat and human. *Neurogastroenterol Motil* 2010; **22**: e325–e334.
- 25 Chan C, Lin HJ, Lin J. Stress-associated hormone, norepinephrine, increases proliferation and IL-6 levels of human pancreatic duct epithelial cells and can be inhibited by the dietary agent, sulforaphane. *Int J Oncol* 2008; **33**: 415–9.
- 26 Vazquez SM, Mladovan AG, Perez C et al. Human breast cell lines exhibit functional alpha2-adrenoceptors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; **58**: 50–61.
- 27 Marinese D, Patel R, Walden PD. Mechanistic investigation of the adrenergic induction of ventral prostate hyperplasia in mice. *Prostate* 2003; **54**: 230–7.
- 28 Murphy CJ, Campbell S, Raki-Sasaki K, Marfurt CF. Effect of norepinephrine on proliferation, migration, and adhesion of SV-40 transformed human corneal epithelial cells. *Cornea* 1998; **17**: 529–36.
- 29 Pullar CE, Zhao M, Song B et al. Beta-adrenergic receptor agonists delay while antagonists accelerate epithelial wound healing: evidence of an endogenous adrenergic network within the corneal epithelium. *J Cell Physiol* 2007; **211**: 261–72.
- 30 Pullar CE, Rizzo A, Isseroff RR. Beta-adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem* 2006; **281**: 21225–35.
- 31 Westfall TC, Westfall DP. Adrenergic agonists and antagonists. In: Brunton LL, Chabner B, Knollman B, eds. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 2011: 277–334.
- 32 Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Ann Rev Neurosci* 2001; **24**: 677–736.
- 33 Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995; **270**: 593–8.
- 34 Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993; **75**: 1389–99.
- 35 He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; **90**: 739–51.
- 36 Kolodkin AL. Semaphorin-mediated neuronal growth cone guidance. *Prog Brain Res* 1998; **117**: 115–32.
- 37 Lin L, Lesnick TG, Maraganore DM, Isacson O. Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends Neurosci* 2009; **32**: 142–9.
- 38 Dickson BJ. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 2002; **298**: 1959–64.
- 39 Tamagnone L, Comoglio PM. Signaling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 377–83.
- 40 Straub RH, Grum F, Strauch UG et al. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* 2008; **57**: 911–21.
- 41 Miller LE, Weidler C, Falk W et al. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 1156–63.
- 42 Marziani D, Tamagnone L, Caparuccia L et al. Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A. *Dev Dyn* 2004; **231**: 839–48.
- 43 Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 289–300.
- 44 Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem* 1971; **40**: 465–500.
- 45 Dalsgaard CJ, Jembeck J, Stains W et al. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in nerve fibers in the human skin. Relation to fibers containing substance P, somatostatin, and vasocactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity. *Histochemistry* 1989; **91**: 35–8.
- 46 Alicea C, Belkowski S, Eisenstein TK, Adler MW, Rogers TJ. Inhibition of primary murine macrophage cytokine production in vitro following treatment with the kappa-opioid agonist U50,488H. *J Neuroimmunol* 1996; **64**: 83–90.
- 47 Reubi JC, Mazzucchelli L, Hennig I, Laissue JA. Local up-regulation of neuropeptide receptors in host blood vessels around human colorectal cancers. *Gastroenterology* 1996; **110**: 1719–26.
- 48 Chamary VL, Loizidou M, Boulos PB, Taylor I, Bumstock G. Changes in vasoconstrictor and vasodilator neurotransmitters in nerves supplying arterioles in developing colorectal polyps. *Colorectal Dis* 2006; **8**: 230–4.
- 49 Hiraide F, Kakoi H. Histochemical study on innervation of glands and blood vessels in nasal polyps. *Acta Otolaryngol Suppl* 1986; **430**: 5–11.
- 50 Fassold A, Falk W, Anders S et al. Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 2892–901.
- 51 Koeck FX, Bobrik V, Fassold A et al. Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis. *J Orthop Res* 2009; **27**: 736–41.

- 52 Weidler C, Holzer C, Harbuz M *et al.* Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005; **64**: 13–20.
- 53 Xiang RH, Hensel CH, Garcia DK *et al.* Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics* 1996; **32**: 39–48.
- 54 Martin-Satue M, Blanco J. Identification of semaphorin E gene expression in metastatic human lung adenocarcinoma cells by mRNA differential display. *J Surg Oncol* 1999; **72**: 18–23.
- 55 Yamada T, Endo R, Gotoh M, Hirohashi S. Identification of semaphorin E as a non-MDR drug resistance gene of human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14713–8.
- 56 Bielenberg DR, Hida Y, Shimizu A *et al.* Semaphorin 3F, a chemorepellant for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1260–71.
- 57 Comoglio PM, Tamagnone L, Giordano S. Invasive growth: a two-way street for semaphorin signalling. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 1155–7.

## 4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rainer Straub danken für seine ansteckende Begeisterung, seinen Ideenreichtum, seine positive und konstruktive Art zu denken und zu arbeiten. Ohne ihn wäre diese Arbeit nie zu Stande gekommen. Die Doktorandenzeit unter seiner Leitung war immer lehrreich, in wissenschaftlicher und menschlicher Hinsicht.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Rheumatologie und Neuroendokrino-Immunologie für stete Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre danken. Luise, Steffi, Christine, Madlen, Alex – ihr habt immer für mich ein offenes Ohr gehabt, habt immer mich unterstützt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Silvia Capellino bedanken für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Ich möchte meiner Familie und Freunden für den Rückhalt danken, vor allem meiner Mutter für eine grenzlose und liebevolle Unterstützung.

## 5 Lebenslauf

<b>Name</b>	Natallia Graf
<b>Geburtsdatum und-ort</b>	23.10.1977, Polozk, Weißrussland/ Belarus
<b>Schulbildung</b>	
1984-1994	Grundschule und Lyzeum mit Schwerpunkt Physik und Mathematik
<b>Akademische Ausbildung und berufliche Tätigkeit</b>	
1994-1998	Studium an der Polozker Staatlichen Universität, Diplom-Wirtschaftswissenschaftlerin
1998-2002	Arbeit in der chemischen Industrie und in der Metallindustrie
2004-2011	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2011	Arbeitserlaubnis als Ärztin

Regensburg, den 07.05.2012

Natallia Graf