

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Rolle des JNK-Signalwegs in der Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinogenese

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von
aus
Magdeburg

Wiebke Lessel
Magdeburg
2017

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Lessel, Wiebke:

„Die Rolle des JNK-Signalwegs in der Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinogenese.“ - 2017.
121 Bl.: 29 Abb., 13 Tab.

Kurzreferat

Die Colitis ulcerosa (CU) ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die mit einer stark erhöhten Inzidenz an kolorektalen Karzinomen einhergeht. Pöhlmann et al. konnten in einem zellulären Colitis-Modell eine Fehlregulation der p-JNK-Expression mit assoziierter Verminderung von p21^{WAF1} und γ -H2AX nachweisen.

Die vorliegende Arbeit überprüft, ob Veränderungen des JNK-Signalwegs auch *in vivo* eine Rolle spielen. Dazu wurden immunhistologische Untersuchungen zur Expression von p-JNK, p21^{WAF1}, γ -H2AX und Ki67 an Kolon-Biopsien und -Resektaten von Patienten mit aktiver CU, CU in Remission, CU-assoziierten Dysplasien und CU-assoziiertem Karzinom (CAC) durchgeführt. Zum Vergleich wurden Biopsien und Resektate von entzündungsfreier Kolonschleimhaut, Sigmadivertikulitiden, sporadischen Adenomen und sporadischen kolorektalen Karzinomen (CRC) herangezogen. Es konnte ein Anstieg der p-JNK2- und p21^{WAF1}-Expression bei aktiver CU und eine Reduktion der p-JNK2- und p21^{WAF1}-Expression bei der CU-assoziierten und der sporadischen kolorektalen Karzinogenese beobachtet werden. Ki67 zeigte eine inverse Expression mit erhöhter Proliferation in der CU-assoziierten und der sporadischen kolorektalen Karzinogenese. Die Expression von p-JNK123 stieg in der aktiven CU und der CU in Remission und sank erst beim CU-assoziierten Karzinom. Der γ -H2AX-Wert lag bei den CAC signifikant unter dem der CRC. Wir vermuten, dass die chronische Entzündung eine fehlregulierte JNK-Aktivität mit verminderter p-JNK2-Expression bewirken könnte, die zu einer fehlerhaften Zellzyklus-Kontrolle, einer erhöhten Proliferation und einem undetektierten DNA-Schaden beiträgt.

Schlüsselwörter

Colitis ulcerosa; Colitis ulcerosa-assoziiertes kolorektales Karzinom; Zellzyklus; JNK-Signalweg; p-JNK1; p-JNK2; p21^{WAF1}; γ -H2AX

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	ii
Inhaltsverzeichnis.....	iii
Abkürzungsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
1. Einleitung	1
1.1. Entzündungsassoziierte Karzinogenese	1
1.1.1. Tumoren und Entzündung.....	1
1.1.2. Colitis ulcerosa	3
1.1.2.1. Allgemeines	3
1.1.2.2. Morphologie der Colitis ulcerosa	3
1.1.2.3. Erkrankungsstadien der Colitis ulcerosa	3
1.1.3 Colitis ulcerosa-assoziiertes kolorektales Karzinom.....	4
1.1.3.1. Epidemiologie und Risikofaktoren.....	4
1.1.3.2. Colitis ulcerosa-assoziierte intraepitheliale Neoplasie.....	4
1.1.3.3. Molekulare Mechanismen der Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinogenese	4
1.2 Regulation des Zellzyklus nach DNA-Schaden	6
1.2.1 Zellzyklus und Zellzyklus-Kontrollpunkte	6
1.2.2 Organisation und Regulation der DNA-Schadens-Antwort.....	6
1.2.3 Bedeutung der Proteinkinase JNK in der DNA-Schadensantwort.....	7
1.2.3.1 Vorkommen und Varianten von JNK	7
1.2.3.2 Regulation des JNK-Signalwegs	8
1.2.3.3 JNK-Substrate und Funktionen.....	9
1.2.4 Bedeutung des Zellzyklusregulators p21 ^{WAF1} in der DNA-Schadensantwort	10
1.2.4.1 Regulation von p21 ^{WAF1}	10
1.2.4.2 Funktionen von p21 ^{WAF1}	10
1.2.5 Bedeutung des DNA-Schadensmarkers γ -H2AX in der DNA-Schadensantwort.....	10
1.2.5.1 Regulation von γ -H2AX.....	11
1.2.5.2 Funktionen von γ -H2AX.....	11
1.2.6 Bedeutung des Proliferationsmarkers Ki67 in humanen Malignomen	11
1.3 Synopsis.....	12

1.4 Zielstellung der Arbeit	13
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Untersuchungskollektiv.....	15
2.1.1.1 Kollektiv Colitis ulcerosa-assoziierter und sporadischer kolorektaler Karzinome.....	16
2.1.1.2 Kollektiv Colitis ulcerosa-assoziierter intraepithelialer Neoplasien und sporadischer kolorektaler Adenome.....	16
2.1.1.3 Kollektiv aktiver und in Remission befindlicher Colitis ulcerosa.....	16
2.1.1.4 Kollektiv der Sigmadivertikulitiden.....	17
2.1.1.5 Kollektiv entzündungsfreier Kontrollen.....	17
2.1.2 Patientencharakteristik.....	17
2.1.3 Lokalisationseinteilung.....	17
2.1.4 Charakteristika der kolorektalen Karzinome.....	17
2.1.4.1 Tumorklassifikation.....	17
2.1.4.2 Histologische Typisierung und Grading der Karzinome.....	18
2.1.5 Charakteristika der kolorektalen Adenome.....	18
2.1.6 Charakteristika der Entzündungsaktivität und -chronizität.....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Materialgewinnung, Fixierung und Einbettung.....	19
2.2.2 Histochemische und Immunhistochemische Reaktionen.....	19
2.2.3 Immunoblotting.....	20
2.2.4 Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion.....	21
2.2.5 Statistische Analysen.....	23
3 Ergebnisse.....	24
3.1 Klinisch-pathologische Daten des Untersuchungskollektives.....	24
3.2 Ergebnisse der immunhistologischen Expressionsanalysen.....	26
3.2.1 Expression von p-JNK2.....	26
3.2.1.1 Kontrollkollektiv.....	26
3.2.1.2 Die p-JNK2-Expression steigt bei aktiver Colitis und sinkt bei Remission signifikant.....	26
3.2.1.3 Signifikante Reduktion der p-JNK2-Expression während der Colitis-assozierten und sporadischen Karzinogenese.....	27
3.2.2 Expression von p-JNK123.....	30
3.2.2.1 Kontrollkollektiv.....	30
3.2.2.2 Signifikante Steigerung der p-JNK123-Expression bei der Colitis-assozierten Entzündung.....	30
3.2.2.3 Reduktion der p-JNK123-Expression bei der Colitis-assozierten und sporadischen Karzinogenese.....	31

3.2.3 Expression von γ -H2AX.....	34
3.2.3.1 Kontrollkollektiv	34
3.2.3.2 Expression von γ -H2AX bei Colitis-assoziiierter Entzündung und Divertikulitis	34
3.2.3.3 Der DNA-Schadensmarker γ -H2AX ist bei der Colitis-assoziierten Karzinogenese im Vergleich zur sporadischen Karzinogenese signifikant vermindert.....	35
3.2.4 Expression von p21 ^{WAF1}	37
3.2.4.1 Kontrollkollektiv	37
3.2.4.2 Die p21 ^{WAF1} -Expression wird bei aktiver Colitis basal hoch- und bei Remission apikal herunterreguliert.....	37
3.2.4.3 Reduktion der p21 ^{WAF1} -Expression und Verlust der zonalen Verteilung bei der Colitis-assoziierten und der sporadischen Karzinogenese	38
3.2.5 Expression von Ki67.....	41
3.2.5.1 Kontrollkollektiv	41
3.2.5.2 Anstieg der Ki67-Expression bei aktiver Colitis und bei Remission	41
3.2.5.3 Erhöhung der Ki67-Expression und Verlust der zonalen Verteilung während der Colitis-assoziierten und der sporadischen Karzinogenese	42
4 Diskussion	44
5 Zusammenfassung.....	61
6 Literaturverzeichnis	62
Anhang	82
Danksagung.....	84
Liste der Veröffentlichungen und anderer wissenschaftlicher Leistungen	85
Ehrenerklärung.....	86
Lebenslauf.....	87

Abkürzungsverzeichnis

AFP	α -Fetoprotein
APC	Adenomatous polyposis coli
AP-1	Aktivatorprotein-1
ASK1	Apoptosesignal-regulierende Kinase 1
ATF2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATM	Ataxia-teleangiectasia-mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM-and Rad3-related
Bax	Bcl2-assoziiert X
Bcl2	B-cell-Lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell-Lymphoma-extra large
CAC	Colitis ulcerosa-assoziiertes kolorektales Karzinom
CAK	CDK-aktivierende Kinase
CC-401	ATP-kompetitiver, selektiver JNK123-Inhibitor
CC-930	ATP-kompetitiver, selektiver JNK123-Inhibitor (Tanzisertib)
CEP-1347	Semisynthetischer Inhibitor der MLK-Familie (KT7515)
CNI-1493	Inhibitor proinflammatorischer Zytokine (Semapimod)
CDC25	Cell division cycle 25-Phosphatasen
CDK	Cyclin-abhängige Kinase, cyclin-dependent kinase
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
c-Fos	cellular-FBJ (Finkel-Biskis-Jinkins) -osteosarcoma oncogene
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chk2	Checkpoint Kinase 2
CIN	chromosomale Instabilität
CIP1	CDK-interagierendes Protein 1
c-Jun	cellular ju-nana 17 oncogene (derived from ASV 17 virus)
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRC	Kolorektales Karzinom
CU	Colitis ulcerosa
DALM	dysplasia associated lesion or mass
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DDR	DNA-Schadens-Antwort
D-JNKI-1	peptinerges JNK1-Inhibitor (XG-102, AM-111)
DNA	Desoxyribonucleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DPC4	Deleted in Pancreatic Carcinoma Locus 4

DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
DSS	dextran sulphate sodium
Fas-Liganden	Ligand des Rezeptors 6 der TNF-Superfamilie
G0-Phase	Gap 0-Phase
G1-Phase	Gap 1-Phase
G2-Phase	Gap 2-Phase
γ-H2AX	phosphoryliertes H2A histone family-member X
HCEC	humane Kolonepithelzellen (human colonic epithelial cells)
HCT116	Humane Kolonkarzinomzelllinie
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hp	maximal vergrößertes Gesichtsfeld (Highpowerfield)
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
Ki67	Protein Kiel 67
KIP	Kinase inhibitory protein
K-ras	Kirsten rat sarcoma oncogene
LOH	Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP2K/MKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kinase
MAP3K/MKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kinasen-Kinase
MC	Morbus Crohn
MEKK1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase 1
MKK4	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 4
MKK7	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 7
MKP	MAPK-Phosphatase
mRNA	messenger-RNA
miRNA	micro-RNA
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MLK	mixed lineage Kinase
myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
NFκB	Nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells
Notch	Transmembranöser, Enzym-gekoppelter Rezeptor
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PCNA	Proliferating-cell nuclear antigene
PIKKs	Phosphatidylinositol 3-Kinase related Proteinkinase
p21^{WAF1}	Protein 21/Wild-type p53-aktivierter Faktor 1
p38	Protein 38 (MAPK)

p53	Protein 53
p-JNK	phospho-JNK, phosphorylierte Form von JNK
RAS	rat sarcoma oncogene
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNS	Reaktive Stickstoffradikale (reactive nitrogen species)
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale (reactive oxygen species)
S-Phase	Synthese-Phase
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
siRNA	small interfering RNA
Sp1	specificity protein 1
SP600125	ATP-kompetitiver JNK-Inhibitor
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAK1	Transformierender Wachstumsfaktor beta-aktivierte Kinase 1
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-Acetat
Upm	Umdrehungen pro Minute
WAF1	Wild-type p53-aktivierter Faktor 1
WNT	wingless/integrated
XG-102 (D-JNKI-1)	spezifischer peptinerges JNK-Inhibitor

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der im Rahmen chronischer Entzündung wirkenden potentiell karzinogenen Einflüsse und ihrer Folgen.....	2
Abb. 2: Vergleich der molekularen Pathogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms und des Colitis-assoziierten Karzinoms.	5
Abb. 3: Zellzyklus und Zellzyklus-Kontrollpunkte.....	7
Abb. 4: MAP3K-MAP2K-MAPK-Signalkaskade.....	8
Abb. 5: Schematische Darstellung der gesteigerten Proliferation auf Basis des <i>in vitro</i> Modells der Colitis ulcerosa.....	13
Abb. 6: Bewertung der Entzündungsaktivität und -chronizität.....	19
Abb. 7: Immunhistologische Evaluation innerhalb der Kolonkrypte.....	22
Abb. 8: Beurteilung der Färbeintensität.....	23
Abb. 9: Expression von p-JNK2.....	III
Abb. 10: Übersicht und Vergleich der p-JNK2-Expression.....	IV
Abb. 11: Expression von p-JNK123.....	V
Abb. 12: Übersicht und Vergleich der p-JNK123-Expression.....	VI
Abb. 13: Expression von γ -H2AX.....	VII
Abb. 14: Übersicht und Vergleich der γ -H2AX -Expression.....	VIII
Abb. 15: Vergleich der p-JNK2-, p-JNK123- und γ -H2AX-Expression.....	VIII
Abb. 16: Expression von p21 ^{WAF1}	IX
Abb. 17: Vergleich der mittleren p21 ^{WAF1} -Expression.....	X
Abb. 18: Vergleich der p21 ^{WAF1} -Expression im basalen Kryptendrittel.....	X
Abb. 19: Vergleich der p21 ^{WAF1} -Expression im mittleren Kryptendrittel.....	XI
Abb. 20: Vergleich der p21 ^{WAF1} -Expression im apikalen Kryptendrittel.....	XI
Abb. 21: Vergleich der pJNK2-Expression und der mittleren p21 ^{WAF1} -Expression.....	XII
Abb. 22: Expression von Ki67.....	XIII
Abb. 23: Vergleich der mittleren Ki67-Expression.....	XIV
Abb. 24: Vergleich der Ki67-Expression im basalen Kryptendrittel.....	XIV
Abb. 25: Vergleich der Ki67-Expression im mittleren Kryptendrittel.....	XV
Abb. 26: Vergleich der Ki67-Expression im apikalen Kryptendrittel.....	XV
Abb. 27: Gegenüberstellung der Gesamt-p21 ^{WAF1} - und Gesamt-Ki67-Expression.....	XVI
Abb. 28: Positiv- und Negativkontrollen der verwendeten Antikörper.....	82
Abb. 29: Immuno-Blot Analysen zur Bestimmung der Spezifität des p-JNK2-Antiköpers.....	83

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Zusammensetzung der Kollektive.	I
Tab. 2: Bewertungsmaßstab für die Aktivität und Chronizität der Entzündung.	18
Tab. 3: Details der verwendeten Primärantikörper für die immunhistologischen Analysen...	20
Tab. 4: Durchschnittliche p-JNK2-, p-JNK123- und γ -H2AX-Expression pro Kollektiv.....	XVII
Tab. 5: Korrelation der mittleren Gesamtexpression von p-JNK2, p-JNK123 und γ -H2AX mit Geschlecht, Lokalisation und der Entzündungsaktivität und –chronizität.	XVIII
Tab. 6: Korrelation der mittleren Gesamtexpression von p-JNK2, p-JNK123 und γ -H2AX mit Geschlecht, Lokalisation, dem histologischen Adenom-Typ und dem Grad der intraepithelialen Neoplasie.	XIX
Tab. 7: Korrelation der Expression aller Marker mit dem Geschlecht, der Lokalisation, der Tumorausdehnung, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, dem Tumorstadium und dem Grading, bei Colitis-assoziiertem Karzinom.	XX
Tab. 8: Korrelation der Expression aller Marker mit dem Geschlecht, der Lokalisation, der Tumorausdehnung, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen, dem Tumorstadium und dem Grading, bei sporadischem Karzinom.	XXI
Tab. 9: Vergleich der Färbeintensitäten von p-JNK2 und p-JNK123 unter den Gruppen. .	XXII
Tab. 10: Entwicklung der mittleren Gesamt-p21 ^{WAF1} und -Ki67-Expression sowie der zonalen Expressionsverteilung.	XXII
Tab. 11: Korrelation der mittleren Gesamtexpression sowie der zonalen Verteilung von p21 ^{WAF1} und Ki67 mit dem Geschlecht, der Lokalisation und der Entzündungsaktivität und –chronizität.	XXIII
Tab. 12: Korrelation der mittleren Gesamtexpression sowie der zonalen Verteilung von p21 ^{WAF1} und Ki67 mit dem Geschlecht, der Lokalisation, dem Adenom-Typ und dem Grad der intraepithelialen Neoplasie.	XXIV
Tab. 13: Analyse des Alterseinflusses auf die Unterschiede zwischen den Kollektiven. ...	XXIV

1. Einleitung

1.1. Entzündungsassoziierte Karzinogenese

1.1.1. Tumoren und Entzündung

Entzündliche Prozesse sind die physiologische Reaktion des Körpers auf Pathogene und Zellschäden, wie Infektionen oder Verletzungen, mit dem Ziel, diese zu beseitigen oder einzudämmen ¹⁸¹. Normalerweise sind Entzündungen selbstlimitierend, da die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine direkt an jene proinflammatorischer Zytokine gekoppelt ist. Bei chronischen Entzündungen jedoch scheinen initiiierende Signale zu persistieren oder die negativen Rückkopplungsmechanismen fehlreguliert zu sein, so dass die Entzündung fortbesteht und sich ihr protektiver Effekt in das Gegenteil wandelt ⁵¹.

Es ist schon lange bekannt, dass eine Verbindung zwischen chronischen Entzündungen und Malignomen besteht. **Epidemiologische Studien** zeigen, dass etwa 25% aller Karzinome mit einer chronischen Infektion oder Entzündung assoziiert sind ^{101 51}. Typische Beispiele sind hepatozelluläre Karzinome bei chronischer Hepatitis, Karzinome des gastroösophagealen Übergangs bei Barrett-Syndrom und kolorektale Karzinome bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ²³⁹. **Antientzündliche Therapien**, zum Beispiel mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), reduzieren dahingegen die Inzidenz bestimmter Karzinome ⁷². Zahlreiche Malignome zeigen zudem, ein **entzündliches Begleitmilieu** bestehend aus Entzündungszellen und Entzündungsmediatoren. Eine mögliche Erklärung dieses inflammatorischen Mikromilieus ist die Steuerung entzündungsassoziiierter Signalwege durch Onkogene wie dem myc-Onkogen oder Mitgliedern der RAS-Familie ^{85 265 249}. Diese bewirken nicht nur die Tumorinitiation selbst sondern fördern durch Schaffung eines entsprechenden entzündlichen Begleitmilieus auch den Erhalt, das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors ²⁶⁰. Umgekehrt setzen tumorassoziierte Entzündungszellen Zytokine frei, die auf Epithelzellen wachstumsfördernd wirken. So werden Zytokine wie TNF α und IL-1 β an die Epithelzellen abgegeben und können **onkogene Transkriptionsfaktoren** wie NF κ B ^{50 240}, AP-1 ²⁴⁸ oder STAT-3 ⁴⁹ aktivieren. Als Folge werden Zielgene der Epithelzellen transkribiert, die an der Inhibition der Apoptose sowie der Förderung der Zellzyklus-Progression, der Angiogenese und der Metastasierung beteiligt sind und zu einem prämaligen Phänotyp führen ^{84 122 124}. Die zur **entzündungsbedingten Reparatur der Gewebsschäden** an flutenden Wachstumsfaktoren tragen zudem zur vermehrten Proliferation prämaligener Zellen und so zur Tumorentstehung bei. Dieser Effekt wird umso stärker, je häufiger sich die Abfolge von Verletzung und Regeneration wiederholt ¹⁴².

Ein wesentlicher Faktor der entzündungsbedingten Tumorgenese ist **oxidativer Stress**, der entsteht wenn ein Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS) und anti-oxidativen Abwehrmechanismen wie Glutathion vorliegt. ROS und RNS werden bei chronischen Entzündungen von Leukozyten und Makrophagen im Übermaß freigesetzt, wohingegen die anti-oxidativen Mechanismen in den alterierten Epithelzellen häufig reduziert sind^{169 156 82}. ROS und RNS können zu Basen-Substitutionen, Deletionen und Insertionen und konsekutiv zur Aktivierung von Onkogenen oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen¹⁷⁴. So lassen sich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bereits in nicht neoplastisch verändertem Gewebe vermehrt p53-Mutationen nachweisen^{308 100}. Zusätzlich kann es zu DNA-Strangbrüchen und Telomerschäden kommen, was unter anderem eine Mikrosatelliteninstabilität nach sich ziehen kann¹⁰⁹. Diese oxidativ bedingten DNA-Schäden scheinen mit Fortbestehen der Entzündung zu akkumulieren¹⁵⁵. Die Schäden durch ROS und RNS beschränken sich nicht nur auf die DNA, sondern betreffen auch Proteine und Lipide. So kann es zu posttranslationalen Proteinmodifikationen kommen, was wichtige zelluläre Funktionen wie Apoptose, DNA-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle beeinträchtigen und so unter anderem das Fortbestehen der Mutationen zusätzlich begünstigen kann^{299 101} (Abb. 1). ROS und RNS bewirken außerdem eine indirekte Aktivierung von MAPKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) -Signalkaskaden mit Induktion proto-onkogener Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, c-Fos und AP-1^{248 33 140}.

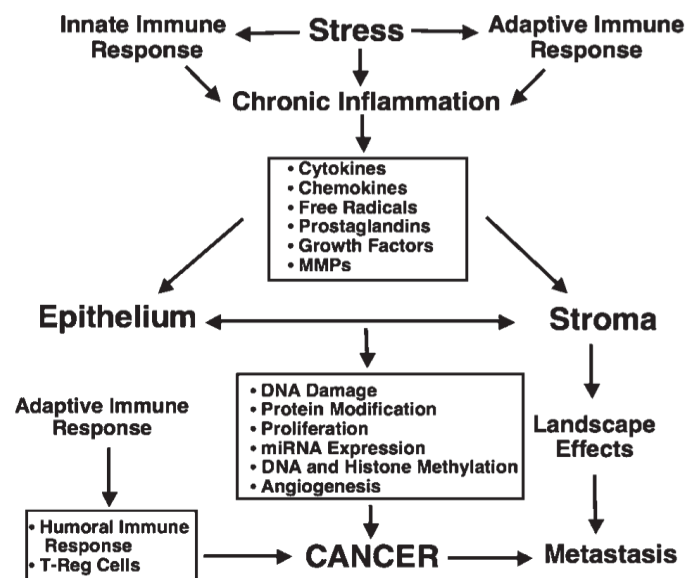


Abb. 1: Schematische Darstellung der im Rahmen chronischer Entzündung wirkenden potentiell karzinogenen Einflüsse und ihrer Folgen. Zytokine, Wachstumsfaktoren, freie Sauerstoffradikale, Prostaglandine u.a. können DNA-Schäden, Proteinmodifikationen, Veränderungen des Genexpressionsprofils und die Expression spezifischer miRNA induzieren. Zusammen mit der Interaktion zwischen Epithel und Stroma sowie den immunsuppressiven Effekten der adaptiven Immunantwort, können diese Veränderungen die Tumorentstehung und -Entwicklung unterstützen. Aus Hussain and Harris, 2007¹⁰¹.

1.1.2. Colitis ulcerosa

1.1.2.1. Allgemeines

Die Colitis ulcerosa (CU) zählt wie der Morbus Crohn (MC) zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Sie ist durch eine chronisch rezidivierende, oft ulzerierende, mukosal betonte Entzündung des Kolons definiert. Klinisch äußert sie sich durch wiederkehrende Erkrankungsschübe mit krampfartigen Bauchschmerzen und schleimigen, zum Teil blutigen Durchfällen mit dazwischen liegenden Remissionsintervallen wechselnder Dauer. Die **Inzidenz** der CU liegt in Deutschland bei 3,0 bis 3,9 pro 100000 Einwohner pro Jahr und war in den letzten Jahren leicht steigend²⁰⁷. Es lassen sich drei Inzidenzgipfel - zwischen dem 20sten und 24sten, dem 40sten und 44sten und zwischen dem 60sten und 64sten Lebensjahr - beobachten, wobei der erste Inzidenzgipfel deutlich über den beiden anderen liegt^{65 183}. Als **ätiologische Faktoren** einer multifaktoriellen Genese werden neben einer genetischen Prädisposition, Umwelteinflüsse, Infektionen und immunologische Faktoren sowie eine Veränderung des Mikromilieus und eine geschwächte Schleimhautbarriere diskutiert^{65 37}.

1.1.2.2. Morphologie der Colitis ulcerosa

Die Morphologie der CU ist stark von der Dauer, dem Schweregrad und der Ausdehnung der Entzündung abhängig. Die Entzündung schreitet klassischerweise vom Rektum ausgehend kontinuierlich nach oral fort. 95 % der Patienten sind lediglich von einer Proktitis betroffen. Eine Pankolitis ist selten^{68 137}. Bei schweren Verläufen kann zusätzlich eine Entzündung des terminalen Ileums, eine sogenannte Backwash-Ileitis auftreten. **Makroskopisch** ist die Schleimhaut in der aktiven CU ödematös, blutreich und granuliert. Flächige, oft longitudinal ausgerichtete Ulzerationen können die angrenzende Schleimhaut unterminieren und so zu einem pseudopolypösen Erscheinungsbild führen. In Remission wirkt die Schleimhaut oft blass, granuliert oder atroph mit verstrichenem Relief. Teils finden sich postinflammatorische Polypen. Es kann aber auch zu einer vollständigen Normalisierung des makroskopischen Erscheinungsbildes kommen. Für die Diagnose einer CU ist neben der Makroskopie sowie klinischen, serologischen und endoskopischen Daten vor allem der histomorphologische Befund entscheidend. Wesentlich sind hier die **histopathologischen Kriterien**, die auch in die S3-Leitlinien für CU von 2011 übernommen wurden und die Erkrankungsstadien definieren^{1 111 268 286}.

1.1.2.3. Erkrankungsstadien der Colitis ulcerosa

Das histomorphologische Bild korreliert meist eng mit der Erkrankungsaktivität. Entsprechend kann die Erkrankung anhand der entzündlichen Veränderungen in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Die **aktive CU** ist vor allem durch ein transmukosales Infiltrat neutrophiler Granulozyten mit Ausbildung von Kryptenabszessen

sowie Erosionen und Ulzeration, einem Schleimhautödem und starken Kryptenarchitekturstörungen gekennzeichnet. Die Aktivität kann wiederum in leicht, mäßig und schwer graduiert werden. In der **Remissionsphase** finden sich keine floriden entzündlichen Veränderungen, allerdings lassen sich meist persistierende Schleimhautschäden wechselnden Ausmaßes in Form von Kryptendistorsionen, einer Kryptenatrophie, einer Paneth-Zell-Metaplasie im linken Kolon sowie einem leicht vermehrten lymphoplasmazellulären und teils auch eosinophilen Infiltrat beobachten. Bei chronisch-rezidivierendem Verlauf ist durchaus ein Nebeneinander von akuten und chronischen Veränderungen zu beobachten. In seltenen Fällen kann es zu fulminanten Verläufen mit Ausbildung eines toxischen Megakolons kommen. Neben dieser schweren Komplikation stellt das erhöhte Risiko kolorektaler Karzinome die Hauptkomplikation dar.

1.1.3 Colitis ulcerosa-assoziiertes kolorektales Karzinom

1.1.3.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

Patienten mit einer CED, insbesondere mit einer CU, haben gegenüber der Allgemeinbevölkerung ein deutlich erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome. Die Gesamtprävalenz eines CU-Patienten, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, liegt bei etwa 3,7%, wobei sich das Karzinomrisiko von 2% nach den ersten 10 Erkrankungsjahren auf 18% nach 30 Erkrankungsjahren erhöht⁶³. Auch ein früher Erkrankungsbeginn, eine starke Intensität und große Ausdehnung der Entzündung sowie Kolonstrikturen und eine zusätzlich bestehende primär sklerosierende Cholangitis, steigern das Karzinomrisiko^{83 278 231 86 277}. Der mit Abstand wichtigste Risikofaktor sind jedoch intraepitheliale Neoplasien. Sie gelten als sogenannte Indikatorläsionen^{217 80}.

1.1.3.2. Colitis ulcerosa-assoziierte intraepitheliale Neoplasie

Als intraepitheliale Neoplasie oder Epitheldysplasie definiert man Epithelveränderungen, die eindeutige Kriterien einer Neoplasie, also zelluläre Atypien und strukturelle Veränderungen wie zum Beispiel Sekundärarchitekturen aufweisen aber nicht invasiv sind. Sie werden als obligate Präkanzerosen gewertet. Anhand des Ausmaßes ihrer Veränderungen werden sie in geringgradige (low grade) und hochgradige (high grade) intraepitheliale Neoplasien eingeteilt²²³. Sie können flach oder polypös sein. Für polypöse Neoplasien wurde der Begriff DALM (dysplasia associated lesion or mass) eingeführt. Je nach Art und Schweregrad der Dysplasie steigt das Risiko eines assoziierten Karzinoms. Am höchsten ist es bei der DALM, hier liegt es bei 43%^{80 16}.

1.1.3.3. Molekulare Mechanismen der Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinogenese

Vergleichbar zur Adenom-Karzinom-Sequenz des sporadischen kolorektalen Karzinoms lässt sich auch bei dem mit der CU-assoziierten kolorektalen Karzinom ein schrittweiser

Übergang von der entzündlich alterierten, regenerativ-hyperplastischen Schleimhaut zur intraepithelialen Neoplasie bis hin zum Karzinom beobachten²²⁴. Die morphologischen Veränderungen basieren auf akkumulierenden genetischen Alterationen von Tumorsuppressorgenen, Onkogenen und DNA-Reparaturgenen. Abbildung 2 fasst die bekannten genetischen und epigenetischen Veränderungen im CU-assoziierten Karzinom im Vergleich zum sporadischen kolorektalen Karzinom zusammen. Während bei über 90% der sporadischen kolorektalen Karzinome aktivierende APC-Mutationen des für die Proliferation gesunder und entarteter Zellen essentiellen **Wnt-/ β -Catenin-Signalweges** sehr früh in der Mutationskette auftreten, lassen sich diese bei CU-assoziierten Karzinomen erst spät im Krankheitsverlauf beobachten^{237 193}. Das lässt sich damit erklären, dass dieser Signalweg bei der CU durch entzündungsassoziierte Signalkaskaden wie NF κ B auch ohne Mutationen verstärkt wird^{271 81 118 149}. Im Gegensatz dazu sind p53-Mutationen bereits in nicht dysplastischer, entzündlich alterierter CU-Schleimhaut nachweisbar^{108 83 38 177 278 278}. Auch eine **Mikrosatelliteninstabilität** lässt sich bei CU zum Teil schon in entzündlich veränderten Epithelien nachweisen. Der Anteil an CU-assoziierten Karzinomen mit Mikrosatelliteninstabilität ist insgesamt jedoch vergleichbar zum sporadischen kolorektalen Karzinom^{165 23 70}.

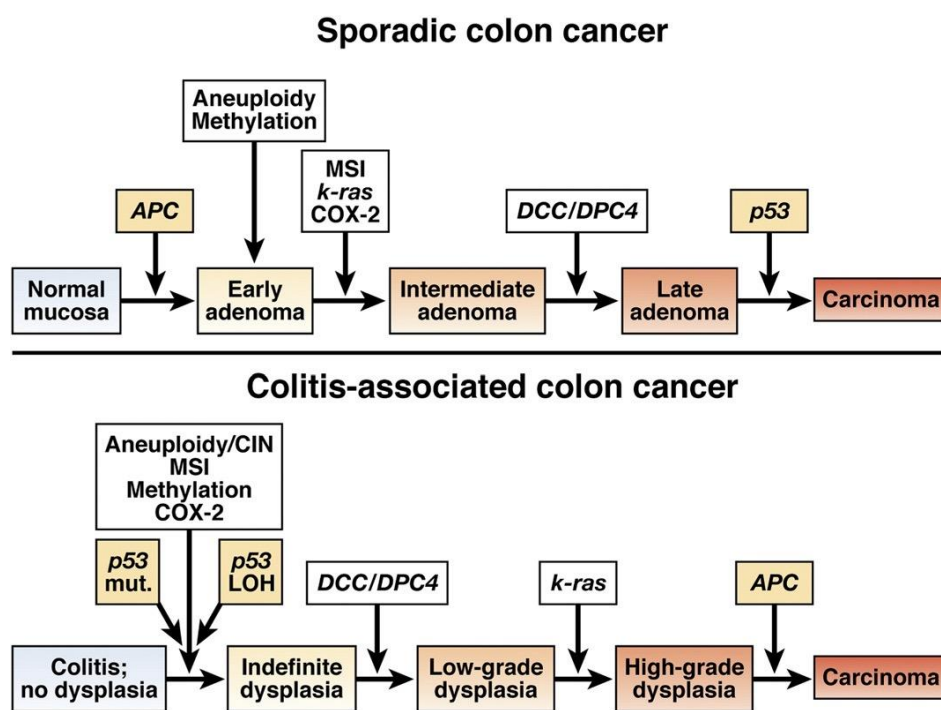


Abb. 2: Vergleich der molekularen Pathogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms (oben) und des Colitis-assoziierten Karzinoms (unten). Beide Karzinogenese-Wege weisen zahlreiche Überschneidungen auf, wie die Entwicklung einer Aneuploidie und chromosomalen Instabilität (CIN), eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI), DNA-Methylierungen, eine Aktivierung des k-Ras-Onkogens, eine Aktivierung von COX-2 (Cyclooxygenase-2), sowie Mutationen oder Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH) der Tumorsuppressor-Gene p53, APC (Adenomatous-polyposis-coli) und DCC/DPC4 (Deleted in Colorectal Cancer/ Deleted in Pancreatic Carcinoma Locus 4). Beide Wege unterscheiden sich jedoch in der Frequenz und Reihenfolge der Veränderungen. Aus Ullman und Itzkowitz, 2011²⁷⁸.

Da DNA-Schäden zu den alltäglichen Folgen exo- und endogener Noxen wie ROS gehören, ist die Zelle auf den Umgang mit diesen Veränderungen vorbereitet. Sie besitzt ein ausgeklügeltes Netzwerk, das sogenannte DNA-Schadensantwortsystem, das die Behebung der entsprechenden Schäden einleitet und reguliert. Damit also die beschriebenen genetischen Alterationen persistieren und akkumulieren können, ist zusätzlich eine Fehlfunktion oder Überforderung der DNA-Schadens-Antwort notwendig^{125 9}. Ein wichtiger Aspekt der DNA-Schadens-Antwort ist die Regulation des Zellzyklus.

1.2 Regulation des Zellzyklus nach DNA-Schaden

Die DNA-Schadens-Antwort umfasst komplexe Kontroll- und Reaktionsmechanismen, um die Zelle vor genetischen Schäden und ihren Folgen zu schützen¹⁸². Über sogenannte DNA-Schadens-Kontrollpunkte kann der korrekte Verlauf des Zellzyklus überwacht und gegebenenfalls ein Zellzyklusarrest eingeleitet werden, um Zeit für die DNA-Reparatur zu gewinnen^{198 317 216}. Eine Deregulation der Zellzyklus-Kontrolle führt zur Persistenz und Akkumulation genetischer Alterationen und mündet in einer gesteigerten und unkontrollierten Proliferation, einem Meilenstein der malignen Transformation^{7 94}.

1.2.1 Zellzyklus und Zellzyklus-Kontrollpunkte

Das Leben einer proliferierenden, eukaryotischen Zelle läuft in einem Zyklus ab, der nach der Zellteilung beginnt und bis zum Ende der darauffolgenden Zellteilung andauert (Abb.3). An kritischen Punkten des Zellzyklus liegen Kontrollpunkte, die von Cyclin-abhängigen Kinase (CDK, cyclin-dependent kinase) -Cyclin-Komplexen gesteuert werden (Abb. 3). Die verschiedenen **CDKs** werden aktiviert indem das entsprechende Cyclin an die regulatorische Untereinheit der CDK bindet. **Cycline** wiederum werden nur in bestimmten Zellzyklus-Phasen synthetisiert. Die Aktivierung des CDK-Cyclin-Komplexes erfolgt durch Bindung des spezifischen Cyclins, Phosphorylierung der **CDK-aktivierenden Kinase (CAK)**, bestehend aus CDK7 und Cyclin H, sowie Dephosphorylierung an seiner ATP-Bindungsstelle. Die **Phosphatasen** der CDC25-Familie wirken dabei als Katalysatoren^{10 234 11} (Abb. 3). Bevor die nächste Phase des Zellzyklus begonnen werden kann, muss der entsprechende CDK-Cyclin-Komplex der vorherigen Phase durch Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau deaktiviert werden¹¹.

1.2.2 Organisation und Regulation der DNA-Schadens-Antwort

Tritt ein DNA-Schaden auf, wird dieser zunächst von Sensoren wie **ATM** und **ATR** erkannt, welche das Signal an Transduktoren oder direkt an Effektoren weiterleiten. Als Transduktoren wirken beispielsweise die Checkpoint Kinasen Chk1 und Chk2, MAP-Kinasen wie JNK oder der DNA-Schadensmarker γ -H2AX, die über Effektoren einen G1/S- und

G2/M-Arrest einleiten können^{235 216}. Zu den Effektoren zählen Proteine der DNA-Reparatur, der Transkriptionsregulation und der Zellzykluskontrolle wie JNK oder p21^{WAF1 317 216}.

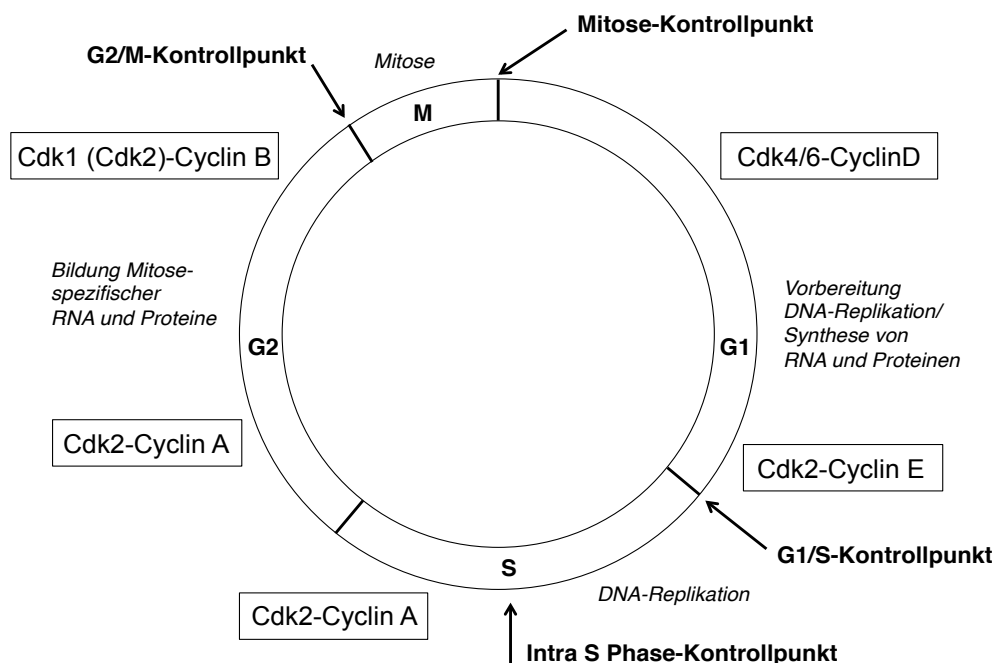


Abb. 3: Zellzyklus und Zellzyklus-Kontrollpunkte. CDK-Cyclin-Komplexe regulieren den Eintritt und den Progress der Zellen in bzw. durch die G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus. Kontrollpunkte halten bei DNA-Schaden die Zellzyklus-Progression am G1/S-, intra-S-, G2/M- und dem mitotischen Kontrollpunkt an. In der frühen G1-Phase ist der CDK4/6-Cyclin D-Komplex aktiv. Daran schließen sich zur Kontrolle des S-Phase-Eintritts und -Durchtritts die CDK2-Cyclin E und CDK2-Cyclin A-Komplexe. Der G2/M-Kontrollpunkt wird durch den CDK1(CDC2)-Cyclin B-Komplex überwacht. Modifiziert nach Poehlmann & Roessner, 2010²¹⁶.

1.2.3 Bedeutung der Proteinkinase JNK in der DNA-Schadensantwort

Die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), einer Gruppe von Serin/Threonin-Proteinkinasen, die essentiell für die Signaltransduktion vor allem von Stresssignalen, wie zum Beispiel ROS sind.

1.2.3.1 Vorkommen und Varianten von JNK

JNK wird bei Säugetieren von drei Genen, *JNK1*, *JNK2* und *JNK3*, kodiert. Dabei werden *JNK1* und *JNK2* ubiquitär exprimiert, wohingegen *JNK3* auf Gehirn, Myokard und Hoden beschränkt ist^{57 20}. Durch alternatives Splicing entstehen insgesamt bis zu 10 Splice-Varianten mit einer Größe von 46 oder 54 kDa^{87 52}, wobei das *JNK1*-Gen überwiegend das 46 kDa Protein (p-46) und das *JNK2*-Gen das 54 kDa Protein (p-54) kodiert¹⁸. Die verschiedenen JNK-Formen unterscheiden sich stark in ihrer Fähigkeit, bestimmte Substrate zu binden und zu phosphorylieren¹⁸.

1.2.3.2 Regulation des JNK-Signalwegs

JNK ist Teil einer mehrstufigen Signaltransduktions-Kaskade, bei der eine sequentielle Phosphorylierungsreaktion das aktivierende Ausgangssignal an JNK weitergibt (Abb.4). Durch duale Phosphorylierung an seinen Threonin183- und Tyrosin185-Resten wird JNK durch die **MAP-Kinase-Kinasen** (MKK / MAP2K) MKK4 und MKK7 aktiviert und als p-JNK bezeichnet (phospho-JNK) ^{298 147}. Die Aktivierung von MKK4 und MKK7 erfolgt ebenfalls durch duale Phosphorylierung durch **MAPKK-Kinasen** (MKKK / MAP3K), von denen bisher etwa 14 MAP3K bekannt sind ⁸⁹. MAP3K wiederum können von unzähligen **extra- und intrazellulären Stimuli** aktiviert werden. Darunter finden sich proinflammatorische Zytokine, wie TNF α und IL-1 Mitglieder der Toll-like-receptor-Familie, Zellstress bei ROS oder onkogener Stress bei Aktivierung bestimmter Onkogene wie Ras ^{128 20 60}. Eine weitere Regulationsmöglichkeit des JNK-Signalweges bieten sogenannte **Gerüst- oder Faltproteine**, welche die drei Proteinkinasen (MAP3K, MAP2K und MAPK) in einem großen Proteinkomplex binden und so die Spezifität der Interaktion erhöhen und die Reaktion verstärken oder beschleunigen können ^{310 57}. Dephosphoryliert und somit inaktiviert wird JNK wie alle MAPK durch gewebs- und signalspezifische **MAPK-Phosphatasen** (MKP) wie MKP 1, 2, 5 oder 6 ^{304 119}.

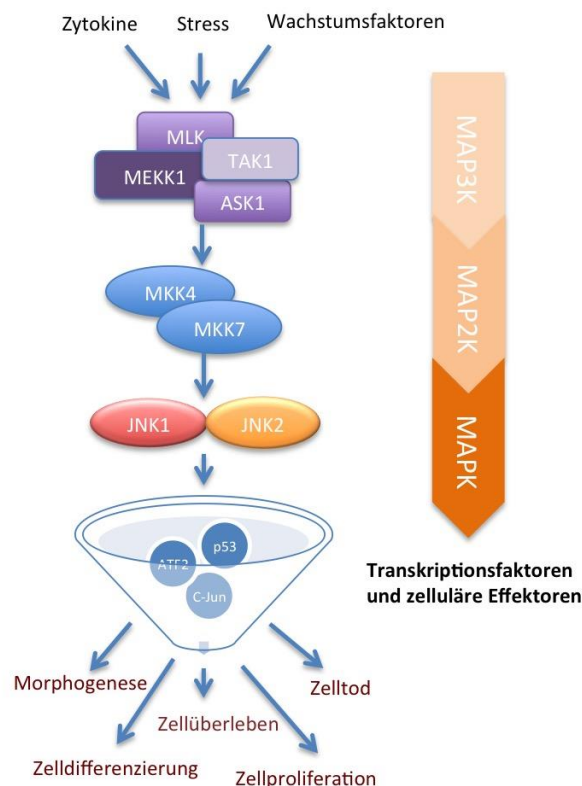


Abb. 4: MAP3K-MAP2K-MAPK-Signalkaskade. MAP3K wie MLK, MEKK1, TAK1 oder ASK1 werden durch extra- und intrazelluläre Stimuli aktiviert, diese phosphorylieren dann die MAP2Ks MKK4 und MKK7, welche dann JNK1 oder JNK2 aktivieren. Diese können über ihre zahlreichen Substrate, wie beispielsweise p53, ATF2 oder c-Jun in verschiedenste Bereiche der Zellfunktion eingreifen. Modifiziert nach Bubic und Papa 2014. ²⁷

1.2.3.3 JNK-Substrate und Funktionen

Über 50 Proteine können von JNK phosphoryliert werden, wie beispielsweise die Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren c-Jun, p53, myc, Bcl2 oder Bax²⁰ (Abb. 4). Zusätzlich kann JNK die Halbwertszeit bestimmter mRNAs verlängern und so deren Translation verstärken¹⁷². Zu den Reaktionen, die JNK beeinflusst, gehören die Gewebshomöostase, Apoptose, Entzündung, Zelldifferenzierung, Proliferationskontrolle sowie ein verlängertes Zellüberleben und eine vermehrte Proliferation^{290 123 298} (Abb. 4).

JNK wirkt an der **Regulation der G1/S-Phase, der S-Phase und der Mitose** mit, indem es den Zellzyklusregulator p21^{WAF1} durch Phosphorylierung stabilisiert¹³⁴. JNK kann nach Stimulation durch Stresssignale p53 phosphorylieren und stabilisieren und so zu einem G1/S-Arrest beitragen³¹. Ein G2/M-Arrest kann durch JNK sowohl unter normalen als auch unter Stressbedingungen durch pJNK-vermittelte Inaktivierung von Cdc25C und -A durch Phosphorylierung oder indirekt über eine Aktivierung der p21^{WAF1}-Transkription über Transaktivierung des Transkriptionsfaktors Sp1 induziert werden^{88 120 246}.

Seine **proliferationsfördernde Wirkung** vermittelt JNK vorwiegend über sein Hauptsubstrat c-Jun²³². Als Teil des Proteinkomplexes AP-1 fungiert c-Jun als Transkriptionsfaktor und die Expression von positiven Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin-D1^{283 285 121 6}. Ebenfalls proliferationsfördernd kann c-Jun wirken, indem es an die p53-Promotor-Region bindet und die p53-Transkription unterdrückt^{241 256}. Andere Studien wiesen nach, dass c-Jun die p21^{WAF1}-Transkription sowohl hemmen als auch aktivieren kann^{291 120}.

JNK kann bei dauerhafter Aktivierung den intrinsischen **Apoptose-Signalweg** induzieren. Dies kann über die Aktivierung von Effektor-Caspasen erfolgen, indem JNK womöglich über die Phosphorylierung und Hemmung von Bcl-2 und Bcl-xL, zur Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien beiträgt oder über die Induktion des Fas-Liganden^{275 307 57}. Der Transkriptionsfaktor myc kann ebenfalls durch JNK phosphoryliert werden und die Apoptose einleiten⁵⁷.

Der JNK-Signalweg spielt auch eine wesentliche Rolle bei der **Reaktion auf Entzündungen** und oxidativen Stress. So ist JNK an der Regulation der T-Zell-Differenzierung und -aktivierung sowie der Synthese verschiedener Zytokine sowie an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis⁹³, der Arteriosklerose und der chronischen Hepatitis beteiligt^{264 2 93 53 172}. Auch bei **CED**, insbesondere bei aktiver CU, wurde eine verstärkte JNK-Aktivierung beobachtet^{187 288 96 287}.

Während der **Tumorentwicklung** kann JNK über c-Jun proliferationsfördernd wirken. So konnte in Tumorzelllinien eine dauerhafte JNK-Aktivierung beobachtet werden¹⁰⁵. Durch seine pro-apoptotische Funktion und seinen Einfluss auf die Zellzyklus-Kontrolle könnte JNK aber auch der Tumorentwicklung entgegen wirken²⁹⁰.

1.2.4 Bedeutung des Zellzyklusregulators p21^{WAF1} in der DNA-Schadensantwort

p21^{WAF1} ist ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, der zur Familie der CIP/KIP (Kinase inhibitory protein) -CDK-Inhibitoren gehört. Es wurde zunächst als CIP1, für CDK-interagierendes Protein 1, oder WAF1, für Wild-type p53-aktivierter Faktor 1 bezeichnet ⁷⁶. p21^{WAF1} hemmt hauptsächlich die Aktivität des CDK2-Cyclin E- und des CDK1-Cyclin B1-Komplexes und verlangsamt so die Zellzyklus-Progression, durch einen G1-, S- und G2-Phase-Arrest ^{75 216}.

1.2.4.1 Regulation von p21^{WAF1}

Die **Transkription** von p21^{WAF1} kann nach DNA-Schaden durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie p53 oder Sp1 direkt oder indirekt über Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren durch Proteine wie JNK induziert werden ^{66 76 303 120 246}. Dementsprechend führt alles, was eine p53-Hemmung bewirkt, zu einer konsekutiven **p21^{WAF1}-Verminderung**, wie beispielsweise die Initiierung der p53-Transkription durch c-Jun mit nachfolgender p21^{WAF1}-Verminderung und konsekutiver Beschleunigung des Zellzyklus ²⁴¹. Zusätzlich kann die p21^{WAF1}-Konzentration auch durch Phosphorylierung und somit Stabilisierung erhöht werden ¹³⁴.

1.2.4.2 Funktionen von p21^{WAF1}

Die Überexpression von p21^{WAF1} resultiert klassischerweise in einem **G1-, G2- und S-Phase-Arrest** ^{204 200}. In normalen menschlichen Zellen liegt p21^{WAF1} in einem Viererkomplex mit einem Cyclin, einer CDK und PCNA vor und fungiert hier als Anordnungsfaktor. Dabei wirkt p21^{WAF1} in niedrigen bis mittleren Konzentrationen eher aktivierend, in hohen Konzentrationen eher hemmend ^{315 145}. Außerdem kann p21^{WAF1} die **DNA-Replikation und -Reparatur** regulieren. Fallen Cyclin und CDK weg, kann p21^{WAF1} direkt PCNA binden und seine Induktion der DNA-Replikation hemmen ²⁸⁹. So koordiniert p21^{WAF1} Zellzyklus-Arrest und -Stopp mit der DNA-Transkription und scheint als **Tumorsuppressor** zu fungieren. So konnte in Studien mit p21^{WAF1}-negativen Mäusen eine erhöhte Tumorneigung nachgewiesen werden, die sich allerdings erst spät manifestierte ^{26 176}. Weitere Studien zeigten, dass die Expression von p21^{WAF1} sowohl in CU-assoziierten als auch sporadischen kolorektalen Karzinomen reduziert ist ^{280 301 59 104 311}.

1.2.5 Bedeutung des DNA-Schadensmarkers γ -H2AX in der DNA-Schadensantwort

H2AX ist eine Isoform des Histons H2A, welches zusammen mit den Histonen H2B, H3 und H4 den oktameren Histonkern bildet, der mit einem darum gewundenen, 147 Basenpaar-messenden DNA-Abschnitt das Nukleosom ergibt ^{164 173}. Codiert wird H2AX von einem Intron-freien Gen (*H2AFX*) ¹⁵¹. H2AX ersetzt H2A je nach Gewebetyp in 2 bis 20 % aller Histon-Oktamere des menschlichen Genoms und ist somit wesentlicher **Bestandteil des**

Chromatins²²⁷. Nach Phosphorylierung an seinem Serin Rest 139 wird H2AX als γ -H2AX bezeichnet.

1.2.5.1 Regulation von γ -H2AX

Direkt nach Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) kommt es im benachbarten Chromatin zu einer massiven **H2AX-Phosphorylierung** durch Mitglieder der Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinase related protein Kinasen (PIKKs) wie **ATM** und **ATR**^{229 317 90 253 30 254}. Diese Akkumulation von γ -H2AX wird auch als nukleärer oder **γ -H2AX-Fokus** bezeichnet. Diese γ -H2AX-Foci liegen im Verhältnis 1:1 zu DNA-Doppelstrangbrüchen vor²²⁶^{245 212}. Die Phosphorylierung von H2AX kann auch durch **andere Formen des DNA-Schadens** wie Einzelstrangbrüche nach UV-Bestrahlung hervorgerufen und bei der Apoptose und zum Teil auch bei der Mitose beobachtet werden^{175 180 305 257 103}. Da sich in Apoptose oder Mitose befindliche Zellen histologisch jedoch gut abgrenzen lassen, gilt γ -H2AX dennoch als ein sehr sensibler und spezifischer Marker für DNA-Schäden und lässt sich gut durch γ -H2AX-Antikörper darstellen^{226 245 212}.

Einige Studien zeigen, dass die γ -H2AX-Foci sich direkt nach Wiederherstellung der DNA-Struktur auflösen¹⁸⁵. Zur Entfernung von γ -H2AX sind zwei womöglich simultan agierende Mechanismen vorstellbar. Zum einen könnte γ -H2AX durch **Phosphatasen**^{44 43} dephosphoryliert werden, zum anderen könnte es über einen **Histonaustausch** von der DNA gelöst und durch unphosphoryliertes H2AX ersetzt werden^{129 44 143}.

1.2.5.2 Funktionen von γ -H2AX

Die Phosphorylierung von H2AX führt zur Einleitung der DNA-Reparatur und Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte^{229 317 90 253 30 254}. γ -H2AX rekrutiert zahlreiche DNA-Schadens-Signal- und -Reparatur-Proteine sowie Proteine der Zellzyklus-Kontrolle, die hier akkumulieren. So spielt γ -H2AX eine wesentliche Rolle bei der **Detektion und Reparatur von DNA-Schäden** sowie der parallelen Synchronisierung des Zellzyklus^{227 272 195}. Des Weiteren scheint es die Chromatinstruktur zu öffnen und den Reparaturproteinen so Zugang zum beschädigten DNA-Abschnitt zu verschaffen und ihnen als eine Art Plattform zu dienen^{141 210 69}. Ein weites Spektrum an **Malignomen** des Menschen weist Mutationen im *H2AX*-Gen auf. Die Häufigkeit der Mutationen lässt vermuten, dass diese die Tumorentstehung und -entwicklung begünstigen und dass H2AX als Tumorsuppressor wirkt^{209 262 202}.

1.2.6 Bedeutung des Proliferationsmarkers Ki67 in humanen Malignomen

Ki67 ist ein nukleäres Antigen, das in allen Zellzyklus-Phasen ausschließlich sich teilender Zellen zu finden ist^{238 78}. Die Ki67-Konzentration wird während des Zellzyklus durch Synthese und Degradation genau reguliert mit einem Maximum zu Beginn der Mitose und einer Halbwertszeit von maximal 90 Minuten^{91 32 238 189 148}.

Zur **Regulation** der Ki67-Expression und seiner spezifischen Funktion im Zellzyklus ist bisher wenig bekannt. Die Transkription von Ki67 wird unter anderem vom Transkriptionsfaktor Sp1 initiiert und von p53 inhibiert^{40 196 132 117}. Ki67 scheint eine essentielle Rolle für die Zellproliferation zu spielen¹⁵³. So führte in Tiermodellen mit Urothel-, Prostata- und Nierenzellkarzinomen die Gabe von antisense Oligonukleotiden zu einer Wachstumsinhibition^{236 126 159 40}. Offenbar erfüllt Ki67 strukturelle Funktionen im Nucleolus und ist hier an der räumlichen Organisation von DNA, RNA und verschiedener Proteinen sowie an der Synthese von Ribosomen beteiligt^{166 213 24}.

Der Anteil immunhistologisch Ki67-positiver Zellen in einem Gewebe entspricht der proliferativen Zellfraktion und wird als **Ki67-Index** bezeichnet²³⁸. Er eignet sich zum einen entzündlich-reaktive, benigne Prozesse von malignen, proliferationsaktiveren Prozessen abzugrenzen^{47 97}. Zum anderen korreliert ein hoher Ki67-Index mit der Tumoraggressivität und gilt als negativer prognostischer Marker in einer Vielzahl von Malignomen wie Karzinomen der Mamma, Prostata, Lunge, Cervix oder Lymphomen^{138 25 102 17 106 46 115 259 312 284}. Die immunhistologische Evaluierung der Ki67-Expression ist inzwischen ein Standardverfahren der histomorphologischen Tumordiagnostik und Bestandteil des Gradings verschiedener Entitäten, wie gastrointestinaler neuroendokriner Tumoren^{79 194 110 138}. Bei anderen Malignomen, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, wird der Ki67 bei der Therapiewahl berücksichtigt^{314 211}.

1.3 Synopsis

Vor dem beschriebenen Hintergrund hat die Arbeitsgruppe um Frau PD Dr. Pöhlmann ein zelluläres Colitis-Modell etabliert, in dem die *in vivo* Bedingungen der CU nachgestellt wurden^{214 215}. Die Zellkulturen humaner Kolonepithelzellen (human colonic epithelial cells, HCEC) wurden dazu in zyklischen Abständen mit Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) behandelt. Zwischen den Behandlungen lagen Erholungsphasen. Dabei zeigte sich in der **akuten Phase** ein Anstieg von p-p46-JNK und p-p54-JNK. Parallel waren eine Zunahme von p21^{WAF1} und γ -H2AX sowie ein konsekutiver Zellzyklus-Arrest zu beobachten (Abb. 5). Mittels Inhibitionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass p21^{WAF1} und γ -H2AX durch JNK reguliert wurden. In der **Remissionsphase** kam es zu einer Verminderung von p-p54-JNK bei gleichzeitiger Erhöhung von p-p46-JNK, was mit einer Reduktion von p21^{WAF1} und γ -H2AX einherging (Abb. 5). Gleichzeitig ließ sich ermitteln, dass die Zellen die Zellzyklus-Kontrollpunkte trotz nachgewiesenem DNA-Schaden überwinden konnten und vermehrt proliferierten. Die beobachteten Veränderungen der Expression der verschiedenen p-JNK-Isoformen mit Reduktion der p-p54-JNK-Isoform bei gleichzeitigem Anstieg der p-p46-JNK-Isoform bei chronischer Entzündung wurden als eine Fehlregulation gewertet. Diese Fehlregulation führte durch Suppression von p21^{WAF1} und γ -H2AX zu einer vermehrten

Überwindung der Zellzyklus-Kontrollpunkte mit erhöhter Proliferation und gleichzeitig maskiertem DNA-Schaden, also zu einer beginnenden malignen Transformation^{215 214}.

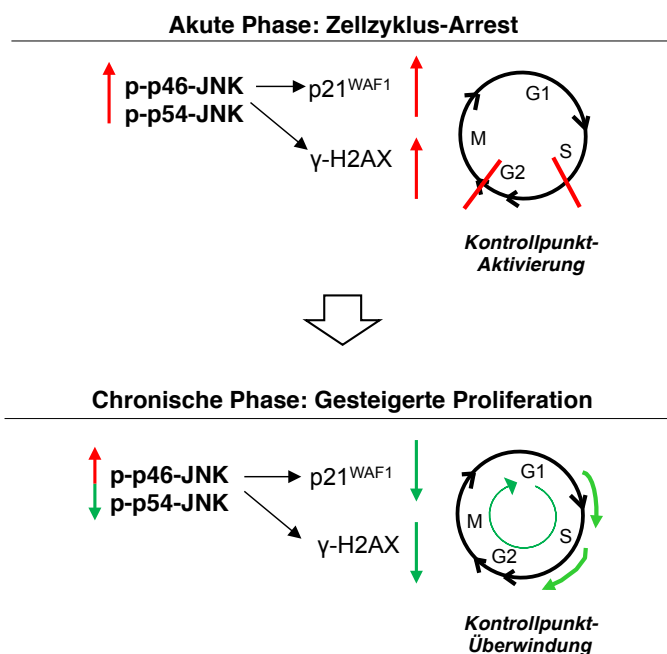


Abb. 5: Schematische Darstellung der gesteigerten Proliferation auf Basis des *in vitro* Modells der Colitis ulcerosa. Entzündungsassoziierter oxidativer Stress bewirkt in der akuten Phase (**oben**) eine Aktivierung des JNK-Signalwegs. Dies führt zu einer Erhöhung der p21^{WAF1}- und γ-H2AX-Spiegel mit konsekutiver Aktivierung der DNA-Schadens-Kontrollpunkte und des Zellzyklus-Arrests. Bei chronischer Belastung mit oxidativem Stress (**unten**) kommt es zu einem Umschalten von Zellzyklus-Arrest zu vermehrter Proliferation. Dies wird durch eine JNK-Fehlregulation mit Erhöhung von p-p46-JNK und Verminderung von p-p54-JNK hervorgerufen, was eine Reduktion von p21^{WAF1} und γ-H2AX bewirkt. Dies wiederum ermöglicht die Überwindung der DNA-Schadenskontrollpunkte, mit vermehrter Proliferation und unerkanntem DNA-Schaden. Modifiziert nach Lessel et al., Carcinogenesis; angenommen März 2017.

1.4 Zielstellung der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die *in vitro* nachweisbaren Veränderungen auch *in vivo* eine Rolle spielen. Dazu führten wir immunhistologische Untersuchungen der identifizierten Signalproteine p-JNK, p21^{WAF1} und γ-H2AX sowie des Proliferationsmarkers Ki67 an Kolon-Biopsien und -Resektaten von Patienten mit aktiver CU, CU in Remission, CU-assoziierten Dysplasien und CU-assoziiertem Karzinom durch. Zum Vergleich zogen wir Biopsien und Resektate entzündungsfreier Kolonschleimhaut, Sigmadivertikulitiden, sporadischer Adenome und sporadischer kolorektaler Karzinome heran. Zum Zeitpunkt der Untersuchung standen keine paraffingängigen Antikörper gegen die JNK-Varianten p-p54 und p-p46 zur Verfügung. Da das JNK1-Gen hauptsächlich die p-46-Variante und das JNK2-Gen vorwiegend die p-54-Variante kodiert, nutzten wir Antikörper gegen p-JNK2 und p-JNK123 zur Bestimmung der JNK-Expression. Ein ausschließlich gegen p-JNK1 gerichteter, paraffingängiger Antikörper war zum Zeitpunkt der

Untersuchungen nicht erhältlich. p-JNK3 wird ausschließlich im Gehirn, dem Myokard und dem Hodenparenchym exprimiert, so dass der p-JNK123-Antikörper im Kolon nur p-JNK1/2 nachweisen sollte, womit eine vergleichende Beurteilung der Reaktion der beiden verwendeten JNK-Antikörper möglich schien.

Ziel der Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob sich auch *in vivo* eine Aktivierung des JNK-Signalwegs bei der aktiven CU beobachten lässt und wie sich die p-JNK-Expression in der Colitis-assoziierten Entzündung und Karzinogenese verhält. Dazu wurde untersucht, ob hier ein Expressionsunterschied zwischen p-JNK2 und p-JNK123 besteht. Außerdem wurde geprüft wie sich die p21^{WAF1}- und γ -H2AX-Expression in der Colitis-assoziierten Entzündung und Karzinogenese entwickeln. Zusätzlich wurde analysiert, ob sich die Veränderungen der p21^{WAF1}- und γ -H2AX-Expression mit denen der p-JNK2- oder p-JNK123-Expression korrelieren lassen und wie sich die Proliferation bzw. die Ki67-Expression in Entzündung und Karzinogenese der Colitis ulcerosa verändert. Abschließend sollte geklärt werden, wie sich p21^{WAF1}- und Ki67-Expression zueinander verhalten und ob die Veränderungen von p-JNK, γ -H2AX und p21^{WAF1} sowie der Proliferation spezifisch für die Colitis-assoziierte Entzündung und Karzinogenese sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungskollektiv

Das Untersuchungskollektiv umfasste insgesamt 265 Fälle. Dabei verteilten sich die Kollektive wie folgt. 40 Fälle (15,1%) mit nicht-entzündlicher und nicht-neoplastischer Kolonmukosa (= Kontrollen), 42 Fälle (15,8%) mit aktiver CU, 40 Fälle (15,1%) mit CU in Remission, 20 Fälle (7,5%) mit Sigmadivertikulitis, 52 Fälle (19,6%) mit CU-assoziierten Dysplasien, 21 Fälle (7,9%) mit sporadischen kolorektalen Adenomen, 30 Fälle mit CU-assoziiertem Karzinom und 20 Fälle mit sporadischem kolorektalem Karzinom (Tab.1).

Der Großteil der Fälle (238, 89,8%) stammte aus dem nicht selektierten fortlaufenden Eingangsgut des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. 18 Fälle (6,8%) wurden dem nicht selektierten Eingangsgut des Academic Department of Pathology, St Mark`s Hospital Harrow, UK, entnommen, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Günther zur Verfügung gestellt wurden. Darüber hinaus wurden uns 5 Fälle (1,9%) freundlicherweise über Frau PD Dr. med. Petra Rümmele und Herrn Prof. Dr. med. Arndt Hartmann aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg überlassen. Weitere 4 Fälle (1,5%) erhielten wir dankenswerterweise über Frau Prof. Dr. med. Andrea Tannapfel aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Leipzig.

Die Entnahme, Asservierung und Verwendung von Gewebe für wissenschaftliche Studien wurde von den Ethikkommissionen der jeweiligen Universitäten genehmigt. Für die CU-assoziierten Kollektive wurde eine zugrunde liegende CU anhand klinischer Angaben, vorrausgegangener bioptischer Befunde und aktueller histomorphologischer Veränderungen sichergestellt. Das Vorliegen einer CED wurde für alle anderen Kollektive histomorphologisch und klinisch-anamnestisch sicher ausgeschlossen.

Tab. 1: Übersicht über die Zusammensetzung der Kollektive.

Gruppe n (%)	Sex m w	Alter±SD (min-max)	Lokalisation I	Lokalisation II - Proximal - Distal	Aktivität Keine Leicht Mäßig Schwer	Chronizität Keine Leicht Mäßig Schwer	Adenom-Typ - Tubulär - Tubulo-villös	Dysplasiegrad - Low-grade - High-grade
Kontrolle 40 (15,1%)	16(40%)	43,4±18,8 (15-76)	Zoe: 2 (5%)	15 (37,5%)				
	24(60%)	>48,5±17,5 51,9±16,2 (24-83)	CA: 11 (27,5%) CT: 2 (5%) CD: 11 (27,5%) Sig: 5 (12,5%) Rek: 9 (22,5%)	25 (62,5%)				
Colitis aktiv 42 (15,8%)	24 (57,1%)	47,5±17,1 (20-73)	Zoe: 3 (7,1%)	6 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)		
	18 (42,9%)	>43,5±15,6 38±11,6 (22-62)	CA: 1 (2,4%) CT: 2 (4,8%) CD: 9 (21,4%) Sig: 12 (28,6%) Rek: 15 (35,7%)	36 (85,7%)	4 (9,5%) 26 (61,9%) 12 (28,6%)	0 (0%) 26 (61,9%) 16 (38,1%)		
Remission 40 (15,1%)	23 (57,5%)	55,2±14,4 (24-78)	Zoe: 3 (7,5%)	16 (40%)	40 (100%)	0 (0%)		
	17 (42,5%)	>49,8±14,8 42,5±12,3 (25-66)	CA: 7 (17,5%) CT: 6 (15%) CD: 9 (22,5%) Sig: 10 (25%) Rek: 5 (12,5%)	24 (60%)	0 (0%) 0 (0%) 0 (0%)	40 (100%) 0 (0%) 0 (0%)		
Divertikulitis 20 (7,5%)	13 (65%)	58,2±13,6 (38-81)	Sig: 20 (100%)	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)		
	7 (35%)	>58,95±14,8 60,3±17,9 (36-84)		20 (100%)	8 (40%) 7 (35%) 3 (15%)	4 (20%) 9 (45%) 7 (35%)		
CU-Dysplasie 52 (19,6%)	41 (78,8%)	49,1±10,6 (31-73)	Zoe: 4 (7,7%)	11 (21,2%)			51 (98,1%)	31 (59,6%)
	11 (21,2%)	>49,2±11 49,8±12,8 (28-74)	CA: 5 (9,6%) CT: 2 (3,8%) CD: 6 (11,5%) Sig: 14 (26,9%) Rek: 21 (40,4%)	41 (78,8%)			1 (1,9%)	21 (40,4%)
Adenom 21 (7,9%)	10 (47,6%)	69,8±8,4 (60-80)	Zoe: 2 (9,5%)	7 (33,3%)			9 (42,9%)	10 (47,6%)
	11 (52,4%)	>65,5±11 61,6±12,1 (47-90)	CA: 3 (14,3%) CT: 2 (9,5%) CD: 3 (14,3%) Sig: 4 (19%) Rek: 7 (33,3%)	14 (66,7%)			12 (57,1%)	11 (52,4%)

Gruppe	Sex m w	Alter± SD (min-max)	Lokalisation I	Lok. II - Proximal - Distal	Tumoraus- dehnung (pT)	Lymphknoten- metastasen (pN)	Fern- metastasen pM	Tumor- stadium (UICC)	Grading (G)
CU-Karzinom	20 (66,7%)	51,9±11,2 (39-75)	Zoe: 4 (13,3%)	12 (40%)	1: 3 (10,7%) *	0: 15 (53,6%)*	0: 22 (78,6%)*	I: 11 (39,3%)	2: 20 (66,7%)
30 (11,3%)		>50,4±12	CA: 6 (20%)	18 (60%)	2: 10 (35,7%)	1: 7 (25%)	1: 6 (21,4%)	II: 4 (14,3%)	3: 10 (33,3%)
	10 (33,3%)	47,4±13,5 (34-74)	CT: 2 (6,7%)		3: 14 (50%)	2: 6 (21,4%)		III: 7 (25%)	
			CD: 3 (10%)		4: 1 (3,6%)			IV: 6 (21,4%)	
			Sig.: 5 (16,7%)						
			Rek: 10 (33,3%)						
Karzinom	12 (60%)	68,2±12,5 (41-84)	Zoe: 3 (15%)		1: 0 (0%)	0: 10 (50%)	0: 19 (95%)	I: 3 (15%)	2: 15 (75%)
20 (7,5%)		>72±12,4	CA: 3 (15%)	7 (35%)	2: 5 (25%)	1: 5 (25%)	1: 1 (5%)	II: 7 (35%)	3: 5 (25%)
	8 (40%)	76,9±10,9 (60-89)	CT: 1 (5%)	13 (65%)	3: 12 (60%)	2: 5 (25%)		III: 9 (45%)	
			CD: 1 (5%)		4: 3 (15%)			IV: 1 (5%)	
			Sig.: 6 (30%)						
			Rek: 6 (30%)						

n = Anzahl; Sex = Geschlecht; SD = Standardabweichung

Lokalisationsbezeichnungen (Lok.): Zoe = Zoekum; CA = Colon ascendens; CT = Colon transversum; CD = Colon descendens; Sig = Sigma; Rek = Rektum

* 2 fehlende Fälle bei Rezidiv

2.1.1.1 Kollektiv *Colitis ulcerosa*-assoziierter und sporadischer kolorektaler Karzinome

Das **Kollektiv CU-assoziierter kolorektaler Karzinome (Colitis-assoziierte Karzinome)** umfasste 30 Patienten, bei denen im Zeitraum von 1993 bis 2015 ein Karzinom des Kolons oder Rektums auf dem Boden einer vorbestehenden CU diagnostiziert wurde. Es handelte sich dabei um drei Schleimhautbiopsien und 10 primäre Tumorresektate aus dem Universitätsklinikum Magdeburg, vier primäre Tumorresektate des Universitätsklinikums Leipzig, fünf primäre Tumorresektate des Universitätsklinikums Regensburg und acht primäre Tumorresektate des St Mark`s Hospital Harrow, UK.

Das **Kollektiv primärer sporadischer kolorektaler Karzinome (sporadische Karzinome)** bestand aus 20 Patienten, bei denen im Jahr 2015 ein sporadisches Karzinom des Kolons oder Rektums diagnostiziert wurde. Alle Patienten erhielten in diesem Zeitraum eine primäre Tumorresektion am Universitätsklinikum Magdeburg.

Bei beiden Kohorten erfolgte die makroskopische Begutachtung der Tumorpräparate und die Entnahme repräsentativer Gewebeproben aus dem Tumor sowie von makroskopisch unauffälliger Schleimhaut entsprechend der interdisziplinären S3-Leitlinien für kolorektale Karzinome ²¹⁹.

Fälle mit einem vererbbaaren Tumor-Syndrom, einer malignen Zweiterkrankung und einer präoperativ durchgeführten Radio- und/oder Chemotherapie wurden nicht in die Studie aufgenommen. Im Rahmen anderer molekularer Studien unserer Arbeitsgruppe wurde für beide Kollektive sichergestellt, dass keine Mikrosatelliteninstabilität vorliegt.

2.1.1.2 Kollektiv *Colitis ulcerosa*-assoziierter intraepithelialer Neoplasien und sporadischer kolorektaler Adenome

Das **Kollektiv der CU-assozierten intraepithelialen Neoplasien (Colitis-assoziierte Dysplasien)** umfasste 52 Fälle aus dem Diagnosezeitraum 1985 bis 2015. Dabei handelte es sich um 32 endoskopisch gewonnene Schleimhautbiopsien und 10 Kolonresektate aus dem Universitätsklinikum Magdeburg. 10 weitere Kolonresektate stammten aus dem St Mark`s Hospital Harrow, UK. Fälle mit „indefinite for dysplasia“ wurden nicht eingeschlossen. Das **Kollektiv der sporadischen kolorektalen Adenome (sporadische Adenome)** bestand aus 21 kolorektalen Adenomen, die allesamt zwischen 2005 bis 2008 am Universitätsklinikum Magdeburg reseziert wurden.

2.1.1.3 Kollektiv aktiver und in Remission befindlicher *Colitis ulcerosa*

Die **Kollektive der aktiven CU (aktive Colitis)** bzw. **in Remission befindlichen CU (Remission)** umfassten 42 bzw. 40 Fälle, die zwischen 2004 und 2014 untersucht wurden. Es handelte sich hierbei ausschließlich um am Universitätsklinikum Magdeburg endoskopisch gewonnene Schleimhautbiopsien.

2.1.1.4 Kollektiv der Sigmadivertikulitiden

Das Kollektiv setzte sich aus 20 in dem Zeitraum von 2001 bis 2006 am Universitätsklinikum Magdeburg resezierten Sigmateilresektaten mit Sigmadivertikulitis (**Divertikulitis**) zusammen. Es wurden nur Fälle ohne zusätzlich bestehende gastrointestinale Grunderkrankung oder Malignom in die Studie aufgenommen.

2.1.1.5 Kollektiv entzündungsfreier Kontrollen

Dieses Kollektiv enthielt 40 kolorektale Schleimhautbiopsien aus dem Diagnosezeitraum 2009 bis 2013 des Universitätsklinikums Magdeburg, die bei klinisch angegebenen rezidivierenden abdominellen Beschwerden endoskopisch gewonnen wurden. Klinisch und histomorphologisch konnten eine Entzündung, eine infektiöse oder ischämische Colitis, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, eine Divertikulitis, ein Mukosa-Prolaps-Syndrom, eine Nahrungsmittelunverträglichkeit, eine NSAR-induzierte Colitis oder eine andersartige gastrointestinale Grunderkrankung ausgeschlossen werden.

2.1.2 Patientencharakteristik

Die patientenbezogenen Daten wurden mit Hilfe von Krankenakten und Arztbriefen, die von den Kliniken der jeweiligen Universität zur Verfügung gestellt wurden und anhand der histopathologischen Befunde des Institutes für Pathologie der jeweiligen Universität erhoben. Für alle Fälle wurden Alter und Geschlecht der Patienten sowie Ursprungslokalisation des untersuchten Gewebes dokumentiert. Für alle Karzinome wurden zusätzlich Stadium und Grading des Tumors erfasst. Für alle intraepithelialen Neoplasien wurden neben Alter und Geschlecht des Patienten der histologische Typ sowie der Grad der intraepithelialen Neoplasie ermittelt.

2.1.3 Lokalisationseinteilung

Zur Beschreibung der Lokalisation der Probeentnahme wurde das Kolon neben seinen anatomischen Unterbezirken in einen proximalen (Zökum – C. transversum) und einen distalen Kolonabschnitt (linke Flexur – anorektaler Übergang) untergliedert.

2.1.4 Charakteristika der kolorektalen Karzinome

2.1.4.1 Tumorklassifikation

Die Stadieneinteilung der Karzinome erfolgte entsprechend der siebten Auflage der UICC (p)TNM-Klassifikation für kolorektale Karzinome³⁰⁰. Die Karzinome wurden anhand von Hämatoxylin- und Eosin-(H&E)-gefärbten Schnittpräparaten und unter Berücksichtigung aller verfügbaren klinischen und pathologischen Daten hinsichtlich der Infiltrationstiefe und lokalen Ausbreitung (pT-Kategorie), des Befalls regionärer Lymphknoten (pN-Kategorie) und des Auftretens von Fernmetastasen (M-Kategorie) klassifiziert.

2.1.4.2 Histologische Typisierung und Grading der Karzinome

Bei den untersuchten kolorektalen Karzinomen handelte es sich ausschließlich um Adenokarzinome, NOS. Sowohl Varianten des siegelringzelligen, medullären, serratierten oder muzinösen Typs als auch Karzinome mit partieller neuroendokriner Differenzierung wurden ausgeschlossen. Die Einteilung des histologischen Malignitätsgrades der Karzinome (Grading) erfolgte entsprechend der Richtlinie der aktuellen WHO-Klassifikation^{116 92}.

2.1.5 Charakteristika der kolorektalen Adenome

Die histologische Typisierung der Adenome erfolgte analog zu den Richtlinien der aktuellen WHO-Klassifikation in tubulär, villös und tubulo-villös. Zudem wurden die intraepithelialen Neoplasien gemäß dem Dysplasiegrad in geringgradig (low-grade) und hochgradig (high-grade) eingeteilt^{92 116}.

2.1.6 Charakteristika der Entzündungsaktivität und -chronizität

Die Charakterisierung der Entzündungsaktivität und –chronizität wurde an allen Fällen mit aktiver CU, CU in Remission und Divertikulitis gleichermaßen in einer vierstufigen Skalierung in den immunhistologisch auszuwertenden Schleimhautarealen vorgenommen (Tab. 2; Abb.6). Die **Aktivität** wurde anhand der Dichte und Verteilung des Infiltrates neutrophiler Granulozyten bestimmt. Areale mit Schleimhautdefekten wurden nicht in die Wertung einbezogen, da diese nicht zur Beurteilung des immunhistologischen Expressionsmusters herangezogen werden konnten. Die **Chronizität** wurde nach Dichte und Verteilung des lymphoplasmazellulären Infiltrates evaluiert. Das Vorliegen einer Entzündung wurde für die entzündungsfreien Kontrollfälle analog des beschriebenen Schemas ausgeschlossen.

Tab. 2: Bewertungsmaßstab für die Aktivität und Chronizität der Entzündung.

Score	Aktivität	Chronizität
0 (negativ)	kein vermehrtes Infiltrat	kein vermehrtes Infiltrat
1 (leicht)	lockeres Infiltrat im Stroma	vermehrtes, lockeres Infiltrat im Stroma
2 (mäßig)	Granulozyten im Epithel (Kryptitis)	Gruppenbildung/ Verdrängung von Krypten
3 (schwer)	Mikroabszesse/ Kryptenabszesse	Ausbildung von Lymphfollikeln

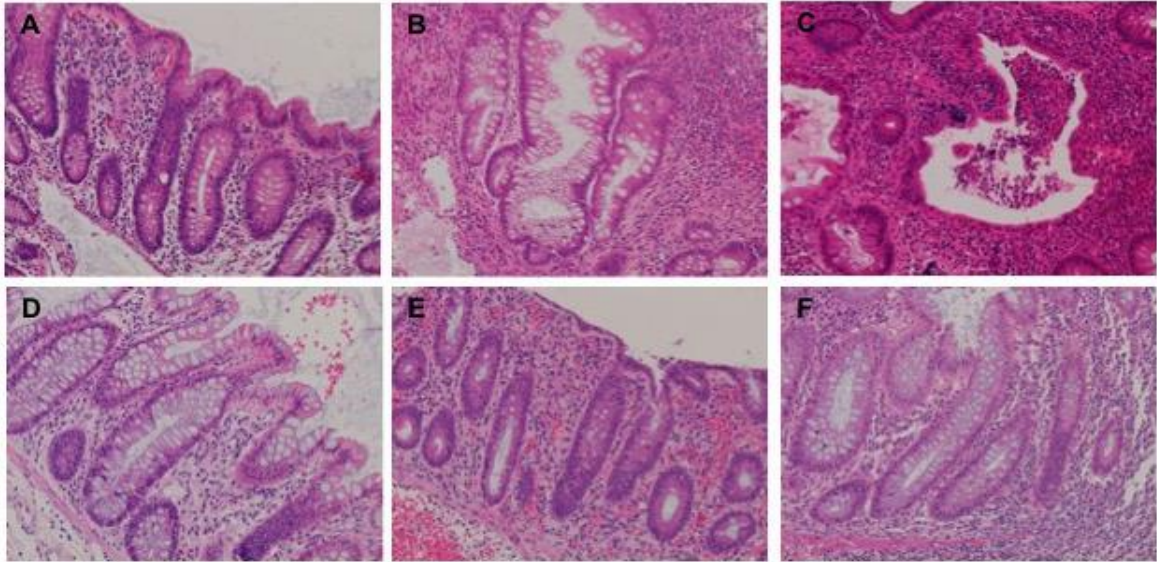


Abb. 6: Bewertung der Entzündungsaktivität und -chronizität (x200).

A – C: Kolonschleimhaut mit leichter (A), mäßiger (B) und schwerer (C) Entzündungsaktivität.

D – F: Kolonschleimhaut mit leichter (D), mäßiger (E) und schwerer (F) Entzündungschronizität.

2.2 Methoden

2.2.1 Materialgewinnung, Fixierung und Einbettung

Die Gewebeproben wurden in 4%iger Formalinlösung fixiert und mittels Äthylalkohol und Xylol in aufsteigender Konzentration automatisiert entwässert (ASP 300S, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland), und in Paraffin eingebettet. Für die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden Schnitte von 2-3 μm Dicke angefertigt (Mikrotom RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland). Als Übersichtsfärbung diente für alle Schnitte die standardisierte Hämatoxylin-Eosin-(H&E)-Färbung.

2.2.2 Histochemische und Immunhistochemische Reaktionen

Die immunhistochemische Detektion der Expression von p-JNK2, p-JNK123, p21^{WAF1}, γ -H2AX und Ki67 erfolgte an 2 μm -dicken Paraffinschnitten. Diese wurden über Nacht bei 60°C getrocknet, in einer absteigenden Xylol- und Alkoholreihe entparaffiniert und abschließend gewässert. Das darauffolgende Procedere erfolgte unter standardisierten Automatenbedingungen im BenchMark® Ultra-Färbeautomaten (Ventana, Tucson, USA). Die Schnitte wurden zur Antigendemaskierung mit Cell Conditioning Solution® (CC1, Ventana) behandelt. Die Inkubationszeit mit dem jeweiligen Primärantikörper betrug für alle Antikörper 32 Minuten. Die detaillierten Angaben zu den verwendeten Primärantikörpern sind Tabelle 3 zu entnehmen. Zur Detektion der Reaktion wurde das *ultraVIEW*TM Universal DAB Detection Kit (Ventana) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein indirektes, Biotin-freies Multimer-System, das Maus-IgG und Maus-IgM sowie Kaninchen-Antikörper bindet. Dieses System

beinhaltet sowohl den *HRP*-markierten (Meerrettichperoxidase) Sekundärantikörper als auch das 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-haltige Chromogen und führt zu einem braunen Präzipitat. Abschließend erfolgten die Kerngegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin nach Mayer, die Entwässerung in einer aufsteigenden Reihe mit Äthylalkohol und Xylol und die Eindeckung mit Kanada-Balsam. Als Positiv- und Negativkontrolle der Antikörper wurde, soweit angegeben, das von den Herstellern empfohlene Gewebe verwendet (Tab. 3) (Abb. 28, Anhang).

Tab. 3: Details der verwendeten Primärantikörper für die immunhistologischen Analysen

Antikörper (Clone)	Species	Klonalität	Verdünnung	Hersteller	Code-Nr.	Testgewebe
JNK2, phospho (Thr183)	r	p	1:1000	Zytomed	210-0031	Kolonschleimhaut
Anti-JNK1+2+3, phospho (EPR5693)	r	m	1:50	Abcam	ab124956	Kolonschleimhaut, Hirnparenchym
gammaH2AX (pSer139)	r	p	1:750	Novus Biologicals	NB100-384	Ovarialkarzinom
p21 ^{WAF1} (EP147)	r	m	1:20	Epitomics	AC-0156	Magenkarzinom
Ki67-Antigen (Mib1)	m	m	1:100	DAKO	M7240	Tonsille

Spezies: r=rabbit, m=mouse; Klonalität: m=monoklonal, p=polyklonal

2.2.3 Immunoblotting

Um die Spezifität des verwendeten, polyklonalen p-JNK2-Antikörpers zu belegen, führten wir Immunoblotting an gesunder Kolonschleimhaut und gesundem Mammaparenchym durch. Dabei verwendeten wir zum einen den p-JNK2-Antikörper sowie einen gegen β -Aktin gerichteten Antikörper (monoclonal Anti- β -Actin, Sigma, Clone AC-13) als Kontrolle. 100 mg Gewebe wurden in 1 ml Lyse-Puffer unter Hinzugabe des frisch hergestellten Proteaseinhibitors (Protease Inhibitor Cocktail Set II, Calbiochem und Phenylmethylsulfonylfluorid, Roth) mittels VWR VDI12 homogenisiert. Danach wurde das Protein-Lysat über zwei Stunden bei 4°C geschüttelt und für 20 Minuten mit 12000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht, bei 4°C unter Schaukeln. Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran wieder standardgemäß 3 x 10 min gewaschen. In dieser Zeit konnten der Sekundärantikörper sowie der Anti-Biotin Antikörper zur Detektion des biotinylierten Molekulargewichtsmarkers vorbereitet werden. Der Sekundärantikörper wurde in Konzentrationen zwischen 1:50 und 1:10.000 im Blockingpuffer verdünnt. Die Membran wurde nun für eine Stunde unter Raumtemperatur und Schaukeln mit den Antikörpern inkubiert. Der Sekundärantikörper war an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Um die spezifischen Proteine sichtbar zu machen, wurde das „*Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate*“

hinzugefügt. Im Anschluss daran konnte der neue gewünschte Primärantikörper über Nacht mit der Membran bei 4° C inkubiert werden. Die Abbildung 29 im Anhang zeigt für p-JNK2, insbesondere für die p-p54-Isoform eine Hauptbande, was zum einen für die hohe Spezifität des verwendeten pJNK2-Antikörpers spricht und zum anderen zeigt, dass der von uns verwendete p-JNK2-Antikörper die p-p54-JNK-Isoform darstellt und so unsere Ausgangsidee rechtfertigt (Abb. 29, Anhang).

2.2.4 Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbereaktion gegen p-JNK2, p-JNK123, γ -H2AX, p21^{WAF1} und Ki67 erfolgte lichtmikroskopisch bei 200- und 400-facher Vergrößerung am Nikon, Eclipse E400 (Nikon, Germany). Es wurde der Anteil positiver Epithelzellen pro Krypte, die Färbeintensität und das Verteilungsmuster der positiven Epithelzellen bestimmt. Für die Färbungen gegen **p21^{WAF1}, γ -H2AX und Ki67** wurde entsprechend der Literatur ausschließlich eine nukleäre Expression als positiv gewertet^{280 104 21}. Bei **p-JNK2 und p-JNK123** ist sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Expression möglich. Letztere ließ sich jedoch schlecht von einer partiell bestehenden unspezifischen Hintergrundaktivität abgrenzen und war zudem ungenügend reproduzierbar, so dass hier in Anlehnung an andere immunhistochemische Arbeiten lediglich eine nukleäre Expression in die Evaluation einfluss^{188 230 292}.

Ausgewertet wurde die Expression der genannten Proteine in den Epithelzellen der Kolonschleimhaut. Dazu wurde bei **Nicht-Tumor-Fällen** eine Schleimhautkrypte möglichst in ihrer gesamten Länge, in einem für die jeweilige Kohorte repräsentativen, intakten Schleimhautareal begutachtet. So wurde beispielsweise bei Fällen mit aktiver CU ein Schleimhautareal mit deutlicher, aktiver Entzündung gewählt, welches jedoch keine großflächigen Epitheldefekte aufwies, damit erhaltene Krypten für die Auswertung vorlagen. Je nach Länge der Krypte erstreckte sich das evaluierte Areal durchschnittlich über ein bis zwei maximal vergrößerte Gesichtsfelder (Highpowerfield, HPF). Bei **Karzinomen** fand sich naturgemäß eine aufgehobene Kryptenarchitektur. Hier wurden drei repräsentative Areale ausgewählt, die sowohl ein unter Umständen inhomogenes Expressionsmuster abbildeten als auch verschiedene Anteile des Tumors, wie Oberfläche, Zentrum und Invasionsfront erfassten. Dabei wurde die Tumoroberfläche in Zone 1, das Tumorzentrum in Zone 2 und die Tumortiefe mit Invasionsfront in Zone 3 eingeteilt. Pro Areal wurde der Anteil positiver Tumorzellen pro 100 Tumorzellen pro Hpf gezählt.

Zur **Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion gegen p-JNK2, p-JNK123 und γ -H2AX** wurde der Anteil positiver Epithelzellen an der Gesamtepithelzellzahl innerhalb einer Schleimhautkrypte sowie dem angrenzenden Oberflächenepithel bestimmt. Dabei wurde

darauf geachtet, dass die Krypte möglichst in ihrer gesamten Länge getroffen und jeder Kryptenabschnitt bei der Auswertung gleichmäßig abgebildet wurde (Abb. 7). Zusätzlich zur Zellzahl wurde dokumentiert, in welchen Kryptenabschnitten sich der Hauptanteil der positiven Zellen befand. Dazu wurde eine Dreiteilung der Krypte vorgenommen, wobei das untere Kryptendrittel mit Kryptenbasis als Zone 1, das mittlere Kryptendrittel als Zone 2 und das apikale Kryptendrittel mit benachbartem Oberflächenepithel als Zone 3 bezeichnet wurden^{230 188}. Für die **Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion gegen p21^{WAF1} und Ki67** wurde ebenfalls der Anteil positiver Epithelzellen an der Gesamtepithelzellzahl innerhalb einer Kolonkrypte ermittelt. Da sowohl die p21^{WAF1}- als auch die Ki67-Expression von der proliferativen Aktivität der Zelle abhängig sind, korreliert die Verteilung beider Proteine im Kryptenepithel stark mit den Proliferationszonen der Krypte. Aus diesem Grund wurden, in Anlehnung an andere immunhistochemische Arbeiten, die verschiedenen Zonen der Krypte getrennt ausgewertet^{280 301 3 201}. Die Aufteilung der Krypte erfolgte dabei wie oben beschrieben in drei Abschnitte (Abb. 7).

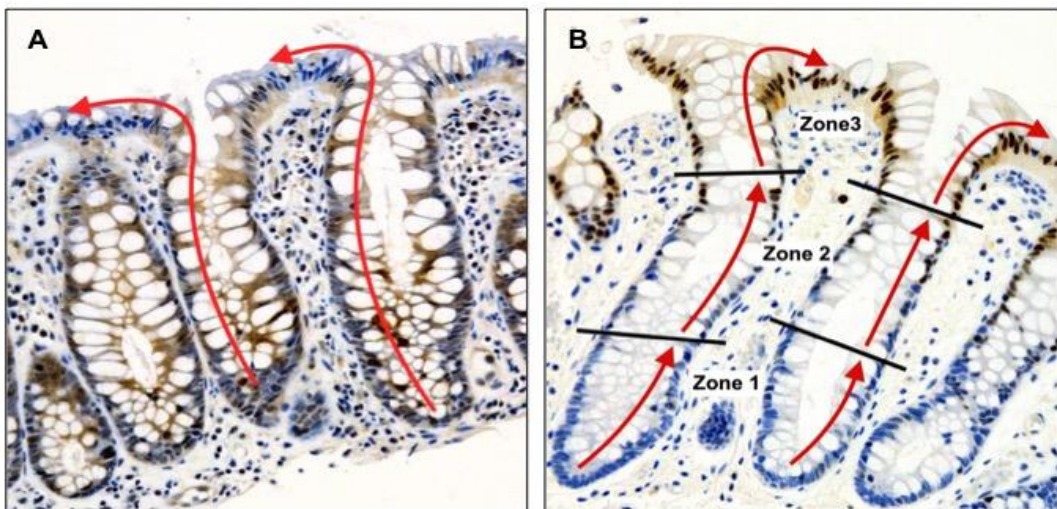


Abb. 7: Immunhistologische Evaluation innerhalb der Kolonkrypte.

(A) Zur Ermittlung des Anteils p-JNK2, p-JNK123 oder γ -H2AX positiver Epithelzellen wurde der Anteil an Zellen mit einer eindeutigen nukleären Färbung an der Gesamtzahl der Epithelzellen einer Kolonkrypte bestimmt. Die Zellen wurden kontinuierlich entlang der gesamten Kryptenlänge von der Kryptenbasis bis zur Kryptenoberfläche gezählt (durchgängiger Pfeil). (p-JNK, x200)

(B) Um den Prozentsatz p21^{WAF1} und Ki67 positiver Zellen zu ermitteln, wurde die Krypte in drei Zonen unterteilt. Zone 1 entspricht dem basalen Drittel, Zone 2 dem mittleren Drittel und Zone 3 dem apikalen Drittel und dem angrenzenden Oberflächenepithel. Die Zellen wurden für jede Zone gesondert evaluiert (geteilter Pfeil). (p21^{WAF1}, x200)

Die **Beurteilung der Färbeintensität** erfolgte anhand einer vierstufigen Skalierung mit 0 (keine Farbreaktion), 1 (schwache Farbreaktion), 2 (moderate Farbreaktion) und 3 (starke Farbreaktion) (Abb. 8). Die ermittelten Werte für den Anteil positiver Zellen und die Färbeintensität wurden einzeln dokumentiert und nicht in einem Score zusammengefasst.

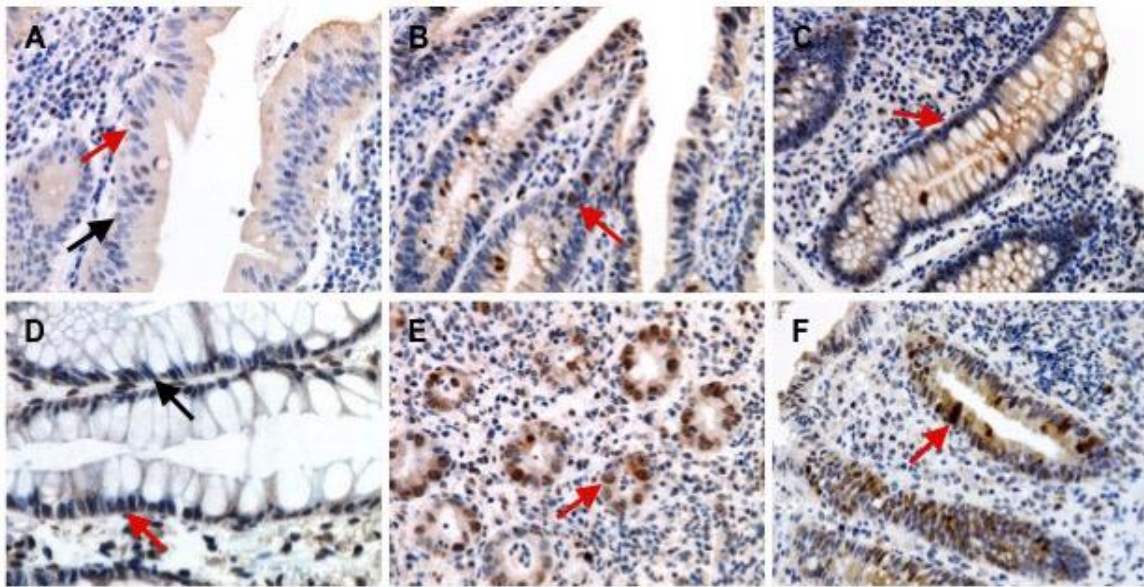


Abb. 8: Beurteilung der Färbeintensität (x400).

p-JNK2 (A-C): Colitis-assoziierte Karzinome mit negativer (A, ⇔) und schwacher (A, ⇐) sowie moderater (B, ⇐) Farbreaktion. Aktive Colitis mit starker Farbreaktion (C, ⇐).

p-JNK123 (D-F): Colitis in Remission mit negativer (D, ⇔), schwacher (D, ⇐) und Colitis-assoziiertes Karzinom mit moderater (E, ⇐) Farbreaktion sowie aktive Colitis mit starker Farbreaktion (F, ⇐).

2.2.5 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung und Darstellung der Daten wurde mit Hilfe von Herrn Dr. rer. nat. Friedrich-Wilhelm Röhl am Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg sowie Frau Prof. Dr. med. Dörthe Jechorek am Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt. Alle Daten wurden mit der Statistiksoftware *IBM® SPSS® Statistics Version 22* analysiert. *P*-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Beschreibung der klinischen Parameter hat die Formel $\bar{x} \pm SD$ für kontinuierliche Variablen oder n (%) für Variablen mit diskreten Ebenen. Eine funktionale univariate Varianzanalyse (ANOVA) mit DUNNETT's Korrektur für α wurde für multiple Vergleiche verwendet, um die Beziehung zwischen dem Durchschnittswert der immunhistochemischen Proteinexpression und den Untersuchungsgruppen oder den klinisch-pathologischen Faktoren der entsprechenden Gruppe zu beurteilen. Für zusätzliche Univariat-Vergleiche (Untergruppen Analysen) zwischen Kategorien in Spezialgruppen wurde der T-test (Welch-Test, Satterthwaites Annäherung zur Berechnung der Freiheitsgrade) ohne α -Adjustierung verwendet. Diese Ergebnisse sollten auf explorative Weise interpretiert werden. Die statistischen Analysen wurden 2-seitig mit einer kritischen Wahrscheinlichkeit von $\alpha = 0.05$ durchgeführt. Zur Analyse des Alterseinflusses auf die Gruppenunterschiede wurde eine 2-faktorielle Varianzanalyse mit Wechselwirkung und Alter als Covariable durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinisch-pathologische Daten des Untersuchungskollektives

Die vollständigen klinisch-pathologischen Daten zu den Kollektiven sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das **Kontrollkollektiv** (n=40) setzte sich aus 16 (40%) männlichen und 24 (60%) weiblichen Individuen zusammen. Das Geschlechtsverhältnis betrug 1:1,5 (m:w). Das Durchschnittsalter lag bei 48,5±17,5 Jahren, dabei waren der jüngste Patient 15 Jahre und der älteste 83 Jahre zum Untersuchungszeitpunkt alt. Die männlichen Individuen wiesen ein Durchschnittsalter von 43,4±18,8 Jahren auf, die weiblichen von 51,9±16,2 Jahren. Aus dem Gesamtkollektiv wurden 15 (37,5%) Fälle aus dem proximalen und 25 (62,5%) aus dem distalen Kolon entnommen.

Das Kollektiv der **aktiven Colitis** (n=42) bestand aus 24 (57,1%) männlichen und 18 (42,9%) weiblichen Individuen, woraus sich ein Geschlechtsverhältnis von 1,3:1 (m:w) ergibt. Das Durchschnittsalter belief sich auf 43,5±15,6 Jahre. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt des Eingriffs 20 Jahre alt, der älteste Patient 73 Jahre. Bei den männlichen Individuen lag das Durchschnittsalter bei 47,5±17,1 Jahren, bei den weiblichen bei 38±11,6 Jahren. Es wurden 6 Fälle (14,3%) aus dem proximalen und 36 Fälle (85,7%) aus dem distalen Kolon entnommen. Der Großteil der Fälle wies eine mäßige Entzündungsaktivität (n=26, 61,9%) auf. Dabei zeigten 12 Fälle (28,6%) eine schwere und 4 Fälle (9,5%) eine leichte Entzündungsaktivität. Ebenfalls 26 Fälle (61,9%) ließen eine mäßige Entzündungschronizität erkennen, bei den restlichen 16 Fällen (38,1%) war eine schwere Entzündungschronizität zu verzeichnen.

Das Kollektiv der **Colitis in Remission** (n=40) setzte sich aus 23 (57,5%) männlichen und 17 (42,5%) weiblichen Individuen zusammen. Das Geschlechtsverhältnis lag somit bei 1,4:1 (m:w). Das Durchschnittsalter betrug 49,8±14,8 Jahre und umfasste eine Altersspanne von 24 bis 78 Jahren zum Untersuchungszeitpunkt. Das Durchschnittsalter der männlichen Individuen lag bei 55,2±14,4 Jahren. Das der weiblichen Individuen lag bei 42,5±12,3 Jahren. Dem proximalen Kolon entstammten 16 Fälle (40%), dem distalen Kolon 24 Fälle (60%). Eine Entzündungsaktivität konnte entsprechend der Definition einer Remission für keinen der 40 Fälle des Gesamtkollektivs nachgewiesen werden. Alle Fälle des Kollektivs (100%) wiesen eine geringe Entzündungschronizität auf.

Das Kollektiv der **Sigmadivertikulitis** (n=20) umfasste 13 (65%) männliche und 7 (35%) weibliche Individuen, womit ein Geschlechtsverhältnis von 1,9:1 (m:w) vorlag. Es ergab sich ein Durchschnittsalter von 59,0±14,8 Jahren, wobei der jüngste Patient 36 Jahre und der älteste 84 Jahre alt waren. Das Durchschnittsalter der männlichen Individuen betrug 58,2±13,6 Jahre, das der weiblichen Individuen 60,3±11,6 Jahre. Bei 8 Patienten (40%) fand

sich eine leichte, bei 7 (35%) eine mäßige und bei lediglich 3 Patienten (15%) eine schwere Entzündungsaktivität. Für 2 Patienten (10%) ließ sich keine Entzündungsaktivität nachweisen. Bezogen auf die Chronizität wiesen 4 Patienten (20%) einen leichten, 9 (45%) einen mäßigen und 7 (35%) einen schweren Entzündungsgrad auf.

Das Kollektiv der **Colitis-assoziierten Dysplasien** (n=52) bestand aus 41 (78,8%) männlichen und 11 (21,2%) weiblichen Individuen. Das Geschlechtsverhältnis lag bei 3,7:1 (m:w). Das Durchschnittsalter betrug $49,2 \pm 11,0$ Jahre, dabei war der jüngste Patient zum Zeitpunkt des Eingriffs 28 Jahre, der älteste 74 Jahre alt. Bei den männlichen Individuen war ein Durchschnittsalter von $49,1 \pm 10,6$ Jahren zu verzeichnen, was nicht nennenswert über dem der weiblichen Individuen mit $49,8 \pm 12,8$ Jahren lag. 11 Fälle (21,2%) wurden dem proximalen und 41 Fälle (78,8%) dem distalen Kolon entnommen. Der Anteil an low-grade intraepithelialen Neoplasien lag bei 59,6% (31 Fälle), der der high-grade intraepithelialen Neoplasien bei 40,4% (21 Fälle).

Das Kollektiv der **sporadischen Adenome** (n=21) wies 10 (47,6%) männliche und 11 (52,4%) weibliche Individuen auf. Das Geschlechtsverhältnis lag bei 0,9:1 (m:w). Bei einem Durchschnittsalter von $65,5 \pm 11,0$ Jahren waren der jüngste Patient zum Entnahmezeitpunkt 47 Jahre und der älteste 90 Jahre alt. Das Durchschnittsalter der männlichen Individuen betrug $69,8 \pm 8,4$ Jahre. Die weiblichen Individuen lagen mit einem Durchschnittsalter von $61,6 \pm 12,1$ Jahren etwas darunter. Es waren 7 Fälle (33,3%) im proximalen und 14 Fälle (66,7%) im distalen Kolon lokalisiert. Bezüglich des histologischen Adenom-Typs, wiesen 9 Fälle (42,9%) eine tubuläre und 12 Fälle (57,1%) eine tubulo-villöse Morphologie auf. Der histologische Differenzierungsgrad war mit 10 Fällen (47,6%) mit low- und 11 Fällen (52,4%) mit high-grade intraepithelialer Neoplasie gleichmäßig verteilt.

Das Kollektiv **Colitis-assoziiertes Karzinome** (n=30) setzte sich aus 20 (66,7%) männlichen und 10 (33,3%) weiblichen Individuen zusammen. Das Geschlechtsverhältnis betrug 2:1 (m:w). Das Durchschnittsalter lag bei $50,4 \pm 12,0$ Jahre wobei der jüngste Patient 34 Jahre und der älteste Patient 75 Jahre zum Zeitpunkt der Resektion waren. Es lag kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Durchschnittsalter der männlichen Individuen mit $51,9 \pm 11,2$ Jahren und dem der weiblichen mit $47,4 \pm 13,5$ Jahren vor. Im Gesamtkollektiv entstammten 12 Fälle (40%) dem proximalen und 18 Fälle (60%) dem distalen Kolon. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wiesen 6 Patienten (21,4%) Fernmetastasen auf. Bei den zwei Rezidivfällen konnten im Vergleich zu den primären Karzinomen keine Differenzen bezüglich der Expressionsmuster der untersuchten Proteine beobachtet werden.

Das Kollektiv der **sporadischen kolorektalen Karzinome** umfasste insgesamt 20 Fälle mit 12 (60%) männlichen und 8 (40%) weiblichen Individuen. Es ergibt sich ein Geschlechtsverhältnis von 1,5:1 (m:w). Das Durchschnittsalter betrug $72,0 \pm 12,4$ Jahre, beginnend bei 41 Jahren bis maximal 89 Jahre zum Zeitpunkt des Eingriffs. Das

Durchschnittsalter der männlichen Individuen lag bei $68,2 \pm 12,5$ Jahren, das der weiblichen Individuen bei $76,9 \pm 10,9$ Jahren. Es stammten 7 (35%) Fälle des Kollektivs aus dem proximalen und 13 (65%) Fälle aus dem distalen Kolon. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose war bei lediglich 1 (5%) Patienten eine Fernmetastase bekannt. Die weiteren klinisch-pathologischen Daten finden sich in Tabelle 1.

3.2 Ergebnisse der immunhistologischen Expressionsanalysen

3.2.1 Expression von p-JNK2

p-JNK2 wurde bei allen Kollektiven nukleär exprimiert. Partiiell ließ sich eine leichte zytoplasmatische Positivität erkennen. Da diese jedoch inkonsistent und schwer zu validieren war, floss in Übereinstimmung mit gängigen Publikationen, nur die nukleäre p-JNK2-Expression in die Wertung ein^{292 230 187}. Es wurde ausschließlich die p-JNK2-Expression im Kolonepithel bestimmt. Eine konsistente zonale Verteilung p-JNK2-positiver Zellen innerhalb der Krypte war bei keinem der Kollektive zu beobachten. Ebenso ließ sich bei keinem der Kollektive eine Korrelation der p-JNK2-Expression mit dem Geschlecht, dem Patientenalter oder der Lokalisation des Gewebes im proximalen oder distalen Kolon nachweisen. Die detaillierten Expressionswerte zu p-JNK2 sind den Tabellen 4 bis 9 zu entnehmen.

3.2.1.1 Kontrollkollektiv

Im nicht entzündlichen, nicht neoplastischen Kryptenepithel der Kontrollen fand sich eine gleichmäßig über die gesamte Krypte verteilte mittlere p-JNK2-Expression von $20,6\% \pm 4,4\%$ (Tab. 4). Gleichzeitig war eine mäßig kräftige Färbintensität mit einem Mittelwert von $2,3 \pm 0,5$ zu beobachten (Tab. 9; Abb. 9).

3.2.1.2 Die p-JNK2-Expression steigt bei aktiver Colitis und sinkt bei Remission signifikant

Das Kryptenepithel in der **aktiven Colitis** zeigte verglichen mit den Kontrollen eine signifikante Zunahme der p-JNK2-Expression um 4,8% auf $25,4\% \pm 4,2\%$ (Tab. 4; Abb. 9). Zusätzlich war auch eine Erhöhung der Intensität mit durchschnittlich $2,7 \pm 0,6$ zu erkennen (Tab. 9). Eine Zunahme der p-JNK2-Expression bei steigendem Schweregrad der **Entzündungsaktivität** war allein für das Kollektiv der aktiven Colitis nicht nachzuweisen (Tab. 5). Es zeigte sich sogar eine geringfügige Abnahme der Expression um 1,2% von der schwächeren zur stärkeren Aktivität ($p=0,595$). Anzumerken ist jedoch, dass der Stichprobenumfang mit 4 Fällen mit geringer und 38 Fällen mit mäßiger oder schwerer Entzündungsaktivität gering beziehungsweise ungleichmäßig verteilt war.

Bei der Colitis in **Remission**, fiel die mittlere p-JNK2-Expression signifikant um 8,6% gegenüber der aktiven Colitis ($p < 0,001$). Sie war mit $16,8\% \pm 4,4\%$ auch gegenüber den Kontrollen signifikant reduziert ($p < 0,001$) (Tab. 4; Abb. 9). Die Färbeintensität sank verglichen mit der aktiven Colitis leicht ab, blieb mit $2,5 \pm 0,6$ gegenüber den Kontrollen jedoch geringfügig erhöht (Tab. 9).

Da sich im Kollektiv der Colitis in Remission ausschließlich Fälle mit fehlender oder geringer Entzündungsaktivität und -chronizität fanden, konnte der Zusammenhang der p-JNK2-Expression mit beiden Faktoren allein für dieses Kollektiv nicht untersucht werden. Gleiches galt für das Kollektiv der aktiven Colitis mit einer ausschließlich mäßigen bis schweren Entzündungsaktivität und -chronizität. Um den Einfluss der Colitis-assoziierten **Entzündungsaktivität und -chronizität** auf die p-JNK2-Expression zu untersuchen, wurden deshalb beide Colitis-Kollektive gemeinsam betrachtet (Tab. 5). Dabei war ein signifikanter Anstieg der mittleren p-JNK2-Expression mit zunehmender Entzündungsaktivität und auch -chronizität zu beobachten. So ergab sich ein Anstieg von $17,6\% \pm 5,2\%$ bei fehlender oder geringer auf $25,3\% \pm 4,2\%$ bei mäßiger oder starker Entzündungsaktivität ($p < 0,001$). Mit Zunahme der Entzündungschronizität stieg das durchschnittliche p-JNK2-Level von $16,8\% \pm 4,4\%$ auf $25,4\% \pm 4,2\%$ ($p < 0,001$).

Um zu überprüfen, ob die Erhöhung von p-JNK2 bei aktiver Entzündung eine Besonderheit der Colitis-assoziierten Entzündung ist, wurden 20 Fälle mit **Sigmadivertikulitis** untersucht. Die p-JNK2-Expression lag hier mit $9,2\% \pm 4,8\%$ signifikant unter jener der Kontrollen ($p < 0,001$) und somit weit unter jener der aktiven Colitis ($p < 0,001$) (Tab. 4; Abb. 9), was sich auch in einer eher schwachen Färbeintensität von $1,5 \pm 0,5$ widerspiegelte (Tab. 5e). Eine Korrelation der p-JNK2-Expression mit der **Entzündungsaktivität** ließ sich für das Kollektiv der Divertikulitis nicht nachweisen ($p = 0,894$) (Tab. 5). Gleiches galt für die **Entzündungschronizität** ($p = 0,624$) (Tab. 5).

3.2.1.3 Signifikante Reduktion der p-JNK2-Expression während der Colitis-assoziierten und sporadischen Karzinogenese

Das Kollektiv der **Colitis-assoziierten Dysplasien** wies eine mittlere p-JNK2-Expression von $13,6\% \pm 4,4\%$ auf (Tab. 4). Dieses Level lag $7,0\%$ unter dem der Kontrollen ($p < 0,001$). Auch im Vergleich zur Colitis in Remission zeigte sich eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) (Tab. 4; Abb. 9). Die Färbeintensität war mäßig kräftig ausgebildet ($2,4 \pm 0,7$) womit sie etwa auf dem Niveau der Kontrollen lag (Tab. 9). Eine Korrelation der p-JNK2-Expression mit dem Grad der **intraepithelialen Neoplasie** ließ sich nicht nachweisen ($p = 0,647$) (Tab. 6).

Das Kollektiv der **Colitis-assoziierten Karzinome** zeigte gegenüber den Colitis-assoziierten Dysplasien eine weitere Reduktion der durchschnittlichen p-JNK2-Expression um 3,6% auf $11,0\% \pm 4,8\%$ ($p=0,015$) (Tab. 4). Diese Verringerung war sowohl gegenüber den Kontrollen als auch gegenüber den Colitis-assoziierten Entzündungen hoch signifikant ($p<0,001$) (Tab. 4; Abb. 9). Parallel nahm auch die Intensität der Färbung leicht ab. Sie lag hier bei $2,0 \pm 0,9$ (Tab. 9). Es wurde der Einfluss der Tumorausdehnung auf die p-JNK2-Expression untersucht (Tab. 7). Dabei zeichnete sich für das **Stadium des Primärtumors** (T-Stadium) kein konsistenter Einfluss ab ($p=0,081$). Mit zunehmendem Befall **regionärer Lymphknoten** (N-Stadium) ließ sich ein kontinuierliches, statistisch nicht signifikantes Absinken der p-JNK2-Expression ablesen ($p=0,512$). Einen gleichartigen Einfluss hatte das Fehlen oder Vorhandensein von **Fernmetastasen** (M-Stadium) auf die p-JNK2-Expression ($p=0,842$). Für das **UICC-Stadium** konnte kein konsistenter Zusammenhang mit dem p-JNK2-Level dargestellt werden ($p=0,607$). Bezüglich des **histologischen Differenzierungsgrades** (Grading) war mit zunehmender Entdifferenzierung ein tendenzieller Anstieg der p-JNK2-Expression erkennbar ($p=0,087$) (Tab. 7).

Die mittlere p-JNK2-Expression der sporadischen **Adenome** lag mit $16,4\% \pm 4,5\%$ signifikant unter jener der Kontrollen ($p<0,001$). Sie war des Weiteren 2,8% höher als die der Colitis assoziierten Dysplasien ($p=0,015$) (Tab. 4; Abb. 9). Die p-JNK2-positiven Zellen zeigten eine mäßig kräftige Intensität mit durchschnittlich $2,1 \pm 0,7$, was etwa der Intensität der Colitis-assoziierten Dysplasien entsprach (Tab. 5e). Der **Adenom-Typ** hatte keinen signifikanten Einfluss auf die p-JNK2-Expression ($p=0,067$). Bei zunehmendem **Grad der intraepithelialen Neoplasie** zeigte sich eine geringe, nicht signifikante Expressionsabnahme ($p=0,331$) von $17,4\% \pm 4,1\%$ bei low-grade intraepithelialer Neoplasie auf $15,5\% \pm 4,8\%$ bei high-grade intraepithelialer Neoplasie (Tab. 6).

Das Kollektiv der **sporadischen Karzinome** zeigte verglichen mit den Kontrollen und auch mit den sporadischen Adenomen eine starke Reduktion der mittleren p-JNK2-Expression auf $11,5\% \pm 2,7\%$ ($p<0,001$). Das Expressionslevel war nahezu identisch mit dem der Colitis-assoziierten Karzinome ($p=0,656$) (Tab. 4; Abb. 9). Das galt auch für die Intensität der Färbung, die vorwiegend mäßig stark ausgeprägt war ($2,2 \pm 0,6$) (Tab. 9). Auch bei den sporadischen Karzinomen wurde der Einfluss der Tumorausdehnung auf die p-JNK2-Expression untersucht (Tab. 8). Die Ergebnisse entsprachen weitgehend denen der Colitis-assoziierten Karzinome. Das **Stadium des Primärtumors** (T-Stadium) zeigte keinen Einfluss auf die p-JNK2-Expression ($p=0,992$). Bezüglich **regionärer Lymphknotenmetastasen** (N-Stadium) war ein geringes, nicht signifikantes Absinken der p-JNK2-Expression mit zunehmendem Stadium erkennbar ($p=0,187$). Des Weiteren konnte

keine Veränderung der p-JNK2-Expression mit Vorhandensein von **Fernmetastasen** (M-Stadium) dargestellt werden ($p=0,855$). Mit steigendem **UICC-Stadium** war ein leichter Abfall der p-JNK2-Level von Stadium 1 bis 3 erkennbar, bei Stadium 4 stieg das p-JNK2-Level erneut an, wobei jedoch anzumerken ist, dass nur ein Fall das Stadium 4 aufwies. Eine statistisch signifikante Korrelation ergab sich nicht ($p=0,548$). Die Betrachtung des **histologischen Differenzierungsgrades** (Grading) ließ eine tendenzielle Verringerung der p-JNK2-Expression mit zunehmender Entdifferenzierung erkennen ($p=0,224$).

Zusammenfassend zeigte sich ein signifikanter Anstieg der p-JNK2-Expression bei der aktiven CU verglichen mit den Kontrollen. Beginnend bei der Colitis in Remission nahm die p-JNK2-Expression über die CU-assoziierten Dysplasien zum Colitis-assoziierten Karzinom signifikant ab. Eine starke Expressionsverminderung war auch bei der sporadischen Karzinogenese sichtbar. Allerdings war die p-JNK2-Reduktion erst bei den sporadischen Karzinomen ebenso deutlich ausgeprägt wie bei den Colitis-assoziierten Karzinomen (Abb. 10).

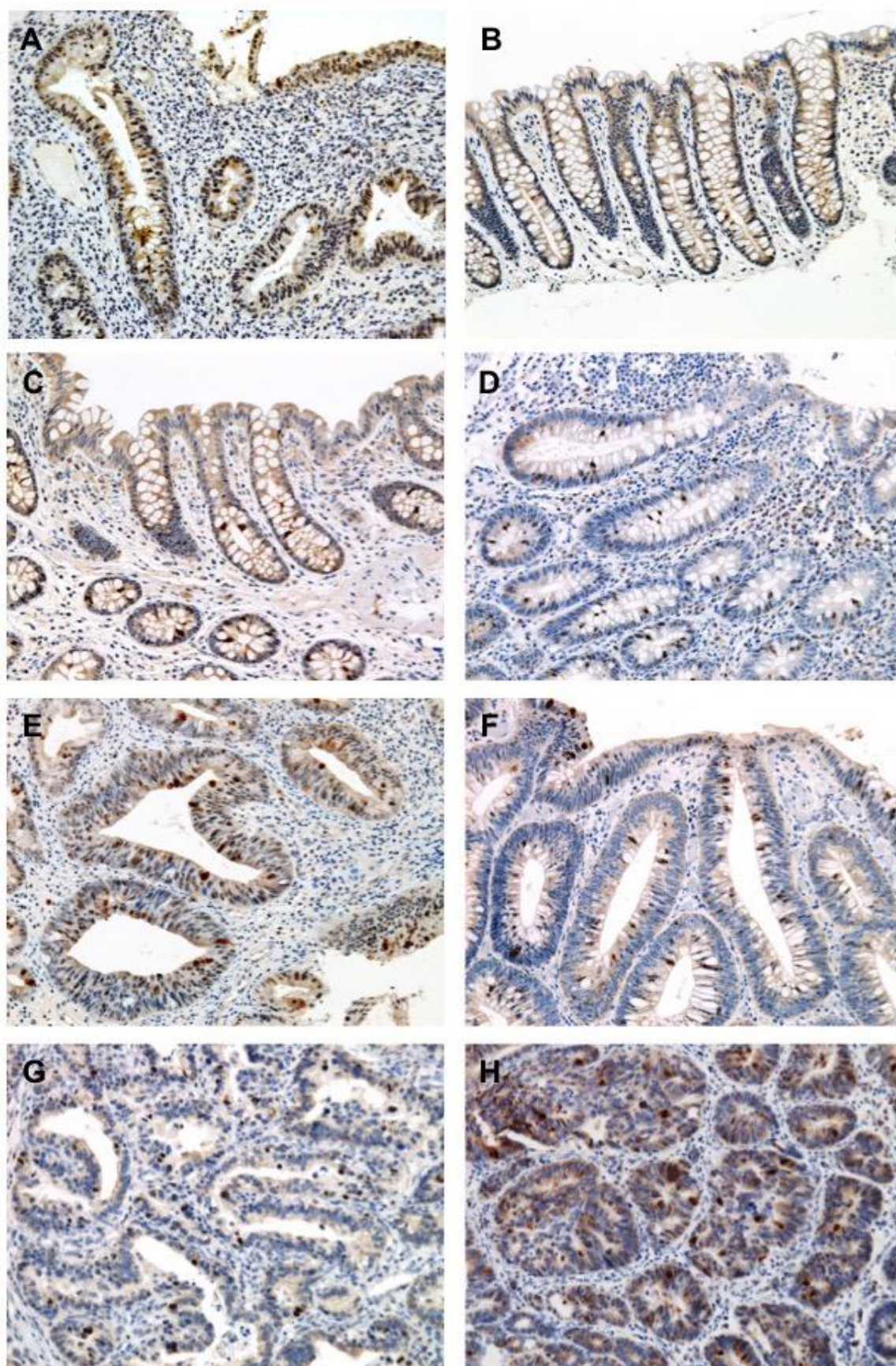


Abb. 9: Expression von p-JNK2 bei aktiver Colitis ulcerosa (A), Kontrollen (B), Remission (C), Divertikulitis (D), Colitis-assoziierten Dysplasien (E), sporadischen Adenomen (F), Colitis-assoziiertem Karzinom (G) und sporadischem kolorektalem Karzinom (H). (x200)

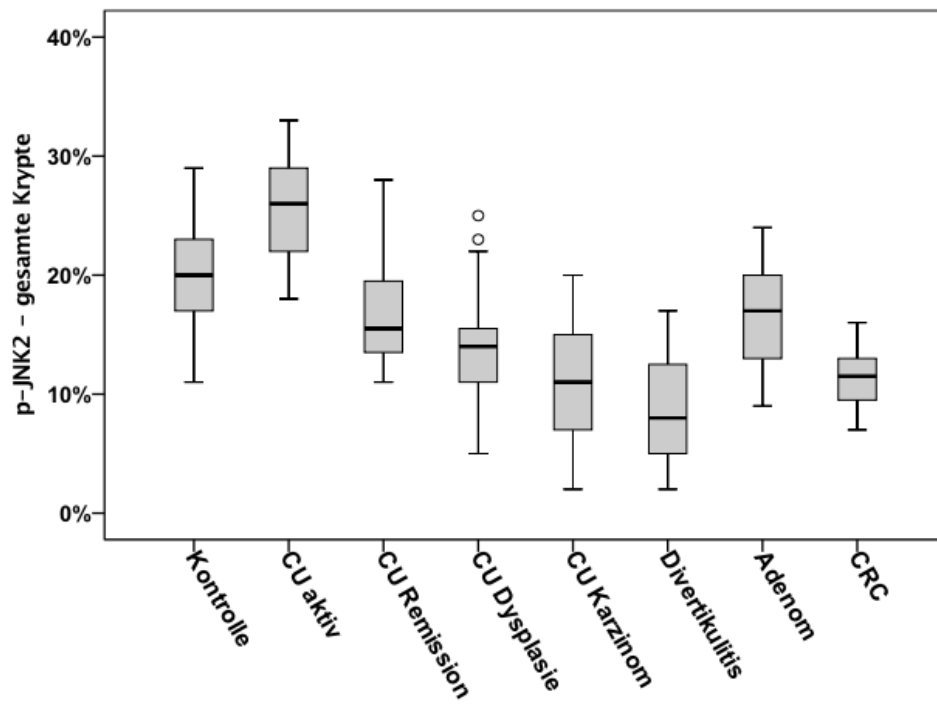


Abb. 10: Übersicht und Vergleich der p-JNK2-Expression zwischen den Kohorten.

3.2.2 Expression von p-JNK123

p-JNK123 wurde bei allen Kollektiven intranukleär exprimiert. Wie bei p-JNK2 war auch bei p-JNK123 partiell eine zytoplasmatische Positivität zu erkennen, jedoch wurde auch hier ausschließlich die nukleäre p-JNK123-Expression im Kolonepithel für die Wertung herangezogen^{292 230 187}. Ein zonales Verteilungsmuster der p-JNK123-Expression innerhalb der Kolonkrypte war bei keinem der Kollektive zu beobachten. Eine signifikante Korrelation der p-JNK123-Expression mit dem Geschlecht, dem Patientenalter oder der Lokalisation des Gewebes im proximalen oder distalen Kolon ließ sich nicht nachweisen. Die ausführlichen Ergebnisse der p-JNK123-Expression sind in den Tabellen 4 bis 9 aufgeführt.

3.2.2.1 Kontrollkollektiv

In dem entzündungs- und dysplasiefreien Kryptenepithel der Kontrollen lag eine kräftige p-JNK123-Expression von durchschnittlich $19,1\% \pm 4,1\%$ vor (Tab. 4; Abb. 11). Die p-JNK123-positiven Zellen waren mäßig bis stark gefärbt mit einer durchschnittlichen Färbeintensität von $2,6 \pm 0,56$ (Tab. 9).

3.2.2.2 Signifikante Steigerung der p-JNK123-Expression bei der Colitis-assoziierten Entzündung

Bei dem Kollektiv der **aktiven Colitis** zeigte sich gegenüber den Kontrollen ein Anstieg der durchschnittlichen p-JNK123-Expression um 15% auf $34,1\% \pm 9,3\%$ ($p < 0,001$) (Tab. 4; Abb. 11). Parallel zur Anzahl p-JNK123-positiver Zellen nahm auch die Intensität der Färbung zu (mittlere Farbintensität $2,9 \pm 0,3$) (Tab. 9). Passend dazu fand sich, anders als bei p-JNK2, mit steigender **Entzündungsaktivität** ein tendenzieller Anstieg der mittleren p-JNK123-Expression ($27,8\% \pm 5,6\%$ bei geringer Entzündung, $34,7\% \pm 9,4\%$ bei mäßiger bis starker Entzündung, $p = 0,154$) (Tab. 5). Anzumerken ist, dass der Stichprobenumfang auch hier nur 4 Fälle mit geringer neben 38 Fällen mit mäßiger oder starker Aktivität aufwies.

Bei der Colitis in **Remission** sank die p-JNK123-Expression demgegenüber signifikant um 7,5% auf $26,6\% \pm 6,9\%$ ($p < 0,001$) (Tab. 4). Im Gegensatz zu der p-JNK2-Expression bei Remission lag die p-JNK123-Expression hier über jener der Kontrollkohorte ($p < 0,001$) (Abb. 11). Auch hier war eine vorwiegend kräftige nukleäre Färbung von durchschnittlich $2,8 \pm 0,4$ zu beobachten (Tab. 9).

Wie bei p-JNK2 wurde auch bei p-JNK123 der Einfluss der **Entzündungsaktivität** und -**chronizität** auf die p-JNK123-Expression für beide Kollektive gemeinsam geprüft (Tab. 5). Dabei fiel ein signifikanter Anstieg der p-JNK123-Expression mit zunehmender Aktivität ($p < 0,001$) und Chronizität ($p < 0,001$) auf ($26,8\% \pm 6,8\%$ bei fehlender oder geringer und

34,8%±9,4% bei mäßiger oder starker Entzündungsaktivität; 26,6%±6,9% bei fehlender oder geringer und 34,1%±9,3% bei mäßiger oder starker Entzündungschronizität).

Wie bereits für die p-JNK2-Expression beschrieben, wurde die p-JNK123-Expression auch bei **Divertikulitis** untersucht, um ein Vergleichskollektiv zu den Kollektiven der Colitis-assoziierten Entzündungen zu haben (Tab. 4). Dabei zeigte sich die p-JNK123-Expression signifikant niedriger als jene der Kontrollen (10,1%±6,8%; $p < 0,001$) bei parallel schwächerer Färbeintensität von 1,7±0,9 (Tab. 9; Abb. 11). Im Gegensatz zur aktiven Colitis war bei der Divertikulitis mit zunehmender **Entzündungsaktivität** ($p = 0,075$) und **-chronizität** ($p = 0,495$) eine tendenzielle Reduktion der p-JNK123-Expression zu erkennen (Tab. 5). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der beobachtete Anstieg der p-JNK123-Expression vor allem mit der Colitis-assoziierten Entzündung in Verbindung steht.

3.2.2.3 Reduktion der p-JNK123-Expression bei der Colitis-assoziierten und sporadischen Karzinogenese

Das Kollektiv der **Colitis-assoziierten Dysplasien** wies gegenüber dem der aktiven Colitis ($p < 0,001$) und dem der Colitis in Remission ($p < 0,001$) eine signifikant verminderte p-JNK123-Expression von durchschnittlich 21,0%±8,7% auf, vergleichbar der bei p-JNK2 beobachteten Expression (Tab. 4). Anders als bei p-JNK2, war die Expression von p-JNK123 gegenüber den Kontrollen nicht verringert sondern minimal erhöht ($p = 0,803$) (Abb. 11). Die Intensität der Expression war jedoch stark, mit im Mittel 2,8±0,6 (Tab. 9). Eine Korrelation der p-JNK123-Expression mit dem Grad der **intraepithelialen Neoplasie** ergab sich nicht ($p = 0,987$) (Tab. 6).

Bei dem Kollektiv der **Colitis-assoziierten Karzinome** war eine deutliche Reduktion der p-JNK123-Expression auf 11,5%±6,6% nachweisbar (Tab. 4). Diese war wie bei p-JNK2 im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv ($p < 0,001$) und den Colitis-assoziierten Entzündungskollektiven ($p < 0,001$) hoch signifikant. Gegenüber den Colitis-assoziierten Dysplasien lag eine ebenfalls hoch signifikante Reduktion von 9,5% vor ($p < 0,001$) (Abb. 11). Auch bei den Colitis-assoziierten Karzinomen war die Färbeintensität stark ausgeprägt (2,5±0,8) (Tab. 9). Es wurde der Einfluss des **primären Tumorstadiums** (T-Stadium) auf die p-JNK123-Expression untersucht (Tab. 7). Dabei war ein kontinuierlicher, tendenzieller Abfall der Expression von Stadium T2 bis T4 zu verzeichnen ($p = 0,212$), allerdings zeigte sich von T1 zu T2 ein Expressionsanstieg. Zwischen dem Ausmaß des Befalls **regionärer Lymphknoten** und der p-JNK123-Expression ließ sich kein konsistenter Zusammenhang erkennen ($p = 0,413$). Auch das Vorhandensein von **Fernmetastasen** wirkte sich nicht nennenswert auf die p-JNK123-Expression aus ($p = 0,871$). Bei Untersuchung der Abhängigkeit des p-JNK123-Levels vom **UICC-Stadium** war von Stadium 1 bis 3 eine

kontinuierliche Expressionsabnahme auszumachen, in Stadium 4 zeigte sich ein geringfügiger Anstieg ($p=0,934$). Die Abnahme des **histologischen Differenzierungsgrades** (Grading) war mit einem leichten Anstieg des p-JNK123-Levels assoziiert ($p=0,359$).

Das Kollektiv der sporadischen **Adenome** zeigte eine mit dem Kontrollkollektiv nahezu identische p-JNK123-Expression ($18,4\% \pm 7,3\%$; $p=1,000$) (Tab. 4) was einen deutlichen Unterschied zu p-JNK2 darstellt. Außerdem war die p-JNK123-Expression, entgegen dem bei p-JNK2 beobachteten Expressionsbild, 2,6% niedriger und nicht höher als die Expression der Colitis-assoziierten Dysplasien ($p=0,256$) (Abb. 11). Die Färbeintensität entsprach jener der Colitis-assoziierten Dysplasien ($2,8 \pm 0,5$) (Tab. 9). Bei Betrachtung des **Adenom-Typs** war bei den tubulo-villösen Adenomen eine geringfügig niedrigere p-JNK123-Expression als bei den tubulären Adenomen erkennbar ($p=0,374$) (Tab. 6). Der **Grad der intraepithelialen Neoplasie** hatte keinen Einfluss auf die p-JNK2-Expression ($p=0,987$) (Tab. 6).

Beim **Vergleich der sporadischen mit den Colitis-assoziierten intraepithelialen Neoplasien** zeigte sich, dass die Expression von p-JNK123 bei den Colitis-assoziierten Dysplasien signifikant höher war als die p-JNK2-Expression ($p=0,001$), wohingegen sich bei den sporadischen Adenomen lediglich ein marginaler Unterschied zwischen der p-JNK123- und der p-JNK2-Expression fand ($p=0,866$) (Tab. 4). Diese Differenz zwischen den Unterschieden der Proteinexpression der beiden Kollektive war statistisch signifikant ($p=0,045$).

Das p-JNK123-Level der **sporadischen Karzinome** lag nur 3,2% höher als das der Colitis-assoziierten Karzinome ($14,7\% \pm 10,7\%$; $p=0,205$) (Tab. 4). Wie bei p-JNK2 fiel hier eine deutliche Verminderung des Expressions-Levels im Vergleich zu den Kontrollen ($p=0,026$) und den sporadischen Adenomen auf ($p < 0,001$) (Abb. 11). Die Intensität der Expression lag etwa auf dem Niveau der Colitis-assoziierten Karzinome ($2,4 \pm 0,7$) (Tab. 9). Bei Untersuchung einer Korrelation der p-JNK123-Expression mit dem **Tumorstadium** (T-Stadium) zeichnete sich eine tendenzielle Abnahme der p-JNK123-Expression von T2 bis T4 ab ($p=0,427$) (Tab. 8). Diese fand sich jedoch nicht zwischen Stadium T1 und T2. Eine konsistente Abhängigkeit der p-JNK123-Expression vom regionären **Lymphknotenstadium** (N-Stadium) war nicht auszumachen ($p=0,671$). Der Fall mit **Fernmetastase** (M-Stadium) zeigte gegenüber den Fällen ohne Fernmetastasen eine deutlich höhere p-JNK123-Expression ($p < 0,001$). Das **UICC-Stadium** zeigte von Stadium 1 bis 3 eine leichte, stetige Abnahme der p-JNK123-Expression, was sich in Stadium 4 jedoch nicht fortsetzte ($p=0,150$). Bezüglich des **histologischen Differenzierungsgrades** (Grading) war mit abnehmender

Differenzierung auch eine tendenzielle Abnahme des p-JNK123-Levels zu erkennen ($p=0,297$).

Zusammenfassend ließ sich ebenso wie bei p-JNK2 ein starker Anstieg der p-JNK123-Expression bei der aktiven Colitis im Vergleich zu den Kontrollen beobachten. Anders als bei p-JNK2 sank das p-JNK123-Level bei Remission gegenüber der aktiven Colitis nur gering und blieb über dem p-JNK123-Level der Kontrollen. Auch bei den Colitis-assoziierten Dysplasien und den sporadischen Adenomen fiel das p-JNK123-Expressions-Niveau nicht unter das der Kontrollen. Erst bei den Colitis-assoziierten und sporadischen Karzinomen glichen sich die p-JNK123- und die p-JNK2-Expression an (Abb. 12).

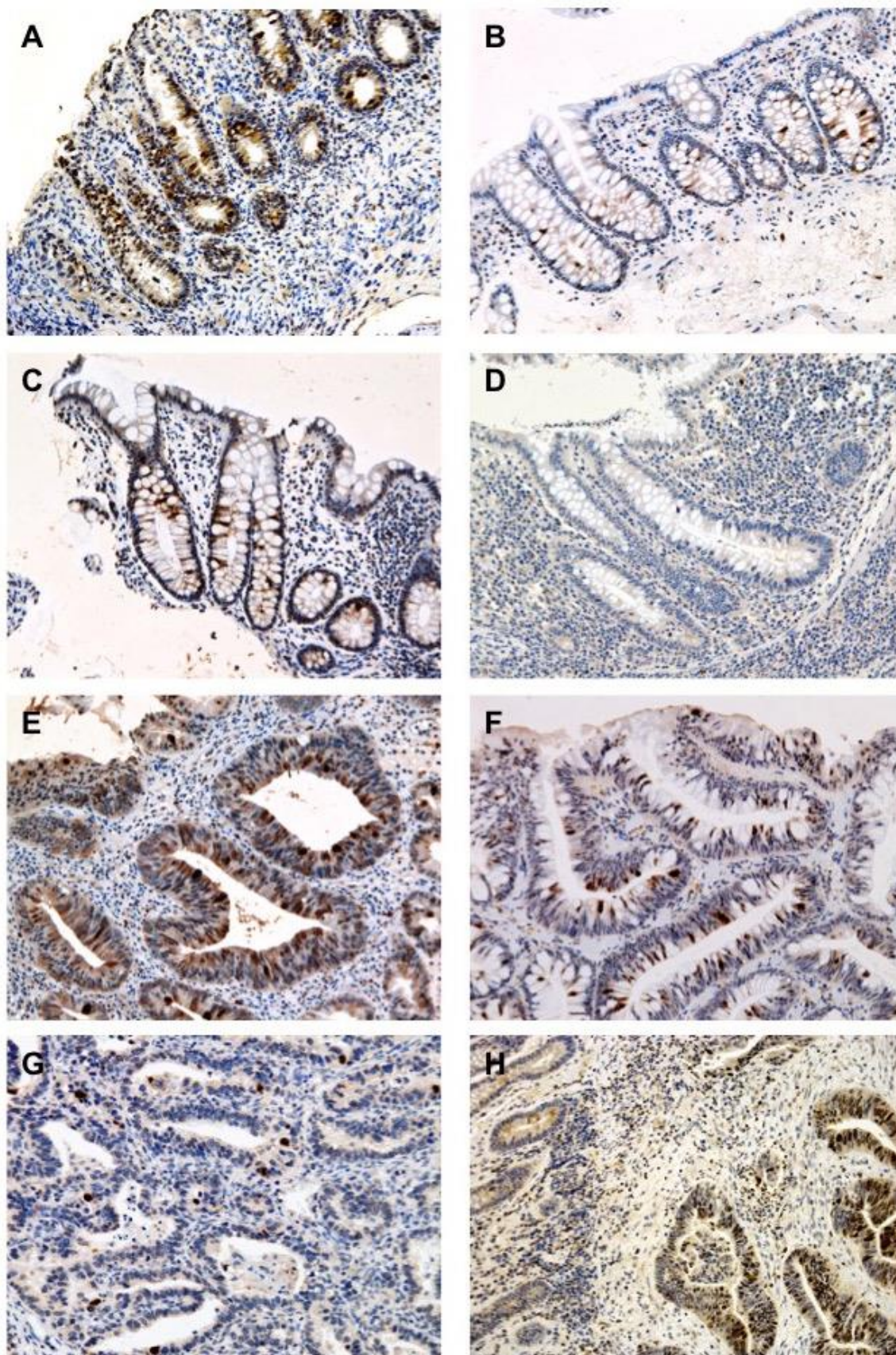


Abb. 11: Expression von p-JNK123 bei aktiver Colitis ulcerosa (A), Kontrollen (B), Remission (C), Divertikulitis (D), Colitis-assoziierten Dysplasien (E), sporadischen Adenomen (F), Colitis-assoziiertem Karzinom (G) und sporadischem kolorektalen Karzinom (H). (x200)

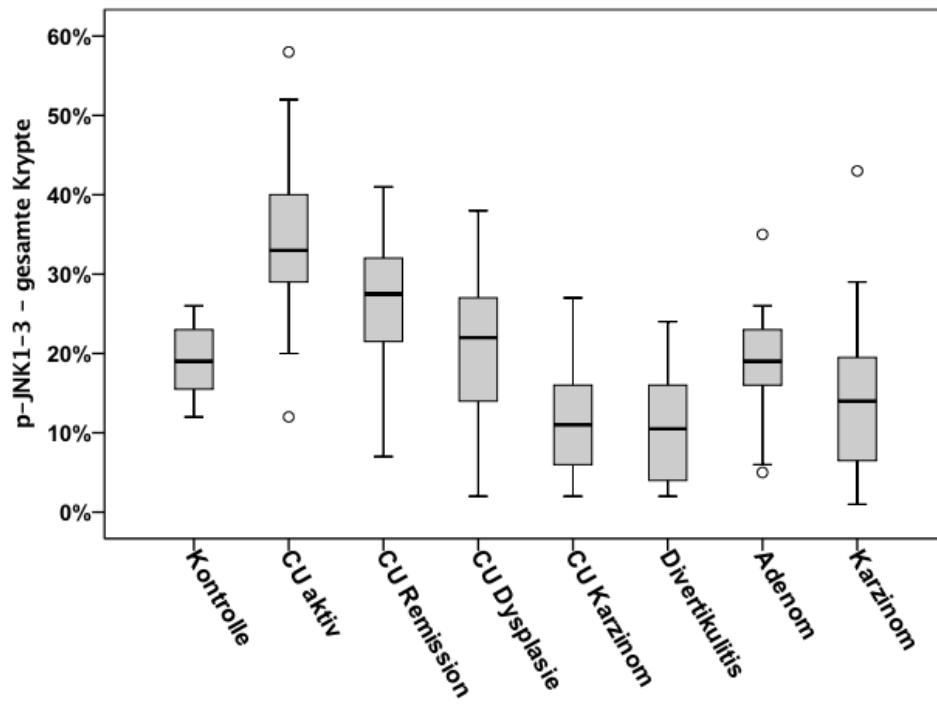


Abb. 12: Übersicht und Vergleich der p-JNK123-Expression.

3.2.3 Expression von γ -H2AX

γ -H2AX wurde in allen Kollektiven nur nukleär exprimiert und zeigte eine ausschließlich starke Färbeintensität. Gewertet wurde nur die Expression im Kolonepithel. Ein zonales Verteilungsmuster innerhalb der Krypte fand sich bei keiner der Stichproben. Eine signifikante Korrelation der γ -H2AX-Expression mit dem Geschlecht, dem Patientenalter, oder der Lokalisation des Gewebes im proximalen oder distalen Kolon ließ sich nicht nachweisen. Die detaillierten Expressionswerte zu γ -H2AX sind in Tabelle 4 bis 8 und 13 aufgeführt.

3.2.3.1 Kontrollkollektiv

Das entzündungs- und dysplasiefreie Epithel der Kolonschleimhaut der Kontrollen zeigte eine durchschnittliche γ -H2AX-Expression von $3,7\% \pm 2,8\%$ (Tab. 4; Abb. 13).

3.2.3.2 Expression von γ -H2AX bei Colitis-assoziiertes Entzündung und Divertikulitis

Bei dem Kollektiv der **aktiven Colitis** war im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen γ -H2AX-Expression auf $6,6\% \pm 4,0\%$ zu verzeichnen ($p < 0,001$) (Tab. 4; Abb. 13). Mit steigender **Entzündungsaktivität** ließ sich eine leichte, nicht signifikante Verminderung der γ -H2AX-Expression von $8,3\% \pm 5,7\%$ auf $6,4\% \pm 3,9\%$ nachweisen ($p = 0,392$) (Tab 5).

Bei der Colitis in **Remission** fiel die γ -H2AX-Expression verglichen mit der aktiven Colitis stark ab ($3,3\% \pm 2,4\%$; $p < 0,001$) und lag etwa auf dem Expressions-Niveau der Kontrollen ($p = 1,000$) (Tab. 4; Abb. 13).

Für beide Kollektive gemeinsam wurde der Einfluss der **Entzündungsaktivität** auf die γ -H2AX-Expression überprüft. Dabei zeigte sich mit steigender Entzündungsaktivität eine signifikante Expressionszunahme von $3,8\% \pm 3,1\%$ auf $6,4\% \pm 3,9\%$ ($p < 0,001$) (Tab. 5). Die Untersuchung der **Entzündungschronizität** erbrachte ein gleichartiges Ergebnis ($3,3\% \pm 2,4\%$ zu $6,6\% \pm 4,0\%$; $p < 0,001$) (Tab. 5).

Das Kollektiv der **Divertikulitis** zeigte eine deutlich über dem Level der Kontrollen liegende γ -H2AX-Expression von $8,1\% \pm 3,6\%$ ($p < 0,110$) (Tab. 4). Auffallend war, dass diese außerdem $1,5\%$ höher war als die γ -H2AX-Expression der aktiven Colitis ($p = 0,174$) (Abb. 13), was möglicherweise auf eine Colitis-getriggerte Verminderung der γ -H2AX-Expression hinweist. Bezüglich der **Entzündungsaktivität** war eine Zunahme der Aktivität mit einem tendenziellen Anstieg der γ -H2AX-Expression vergesellschaftet ($7,6\% \pm 3,1\%$ auf $8,5\% \pm 4,2\%$; $p = 0,592$) (Tab. 5). Ein etwas geringerer Anstieg der γ -H2AX-Expression fand sich in

Korrelation mit der Stärke der **Entzündungschronizität** ($7,5\% \pm 1,7\%$ auf $8,2\% \pm 4,0\%$; $p=0,744$) (Tab. 5).

3.2.3.3 Der DNA-Schadensmarker γ -H2AX ist bei der Colitis-assoziierten Karzinogenese im Vergleich zur sporadischen Karzinogenese signifikant vermindert

Das Kollektiv der **Colitis-assoziierten Dysplasien** zeigte gegenüber den Kontrollen ($p<0,001$) sowie den Kollektiven mit Colitis-assoziiierter Entzündung ($p<0,001$) einen signifikanten Anstieg der γ -H2AX-Expression auf $11,5\% \pm 6,3\%$ (Tab. 4; Abb. 13). Mit zunehmendem Schweregrad der **intraepithelialen Neoplasie** fand sich eine tendenzielle Erhöhung der γ -H2AX-Expression ($p=0,049$) (Tab. 6).

Bei dem Kollektiv der **Colitis-assoziierten Karzinome** fiel eine weitere Erhöhung der γ -H2AX-Expression auf ($16,9\% \pm 10,8\%$). Diese war gegenüber den Kontrollen ($p<0,001$), den Kollektiven mit Colitis-assoziiierter Entzündung ($p<0,001$) und auch gegenüber den Colitis-assoziierten Dysplasien ($p<0,001$) hoch signifikant (Tab. 4; Abb. 13). Bei Untersuchung des **Stadiums des Primärtumors** (T-Stadium) war kein konsistenter Einfluss auf die γ -H2AX-Expression auszumachen ($p=0,721$) (Tab. 7). Auch bezüglich des Befalls **regionärer Lymphknoten** (N-Stadium) ließ sich kein konsistenter Zusammenhang mit dem γ -H2AX-Level ablesen ($p=0,206$). Beim Vorliegen von **Fernmetastasen** (M-Stadium) zeigte sich eine tendenziell höhere γ -H2AX-Expression als ohne Fernmetastasen ($p=0,641$). Für das **UICC-Stadium** konnte wiederum kein konsistenter Einfluss auf die γ -H2AX-Expression dargestellt werden ($p=0,317$). Die Analyse des **Gradings** erbrachte eine tendenzielle Abnahme der γ -H2AX-Expression mit zunehmender Entdifferenzierung ($p=0,544$).

Die mittlere γ -H2AX-Expression der sporadischen **Adenome** entsprach mit $10,9\% \pm 5,3\%$ weitestgehend jener der Colitis-assoziierten Dysplasien ($p=0,664$) (Tab. 4). Sie lag damit signifikant über der γ -H2AX-Expression der Kontrollen ($p<0,001$) (Abb. 13). Der **Adenom-Typ** hatte keinen signifikanten Einfluss auf die γ -H2AX-Expression ($p=0,766$) (Tab. 6). Beim **Grad der intraepithelialen Neoplasie** zeigte sich eine tendenzielle Zunahme des Expressionslevels von der low- zur high-grade intraepithelialen Neoplasie ($p=0,397$) (Tab. 6).

Beim Kollektiv der **sporadischen Karzinome** fiel eine drastische Erhöhung der durchschnittlichen γ -H2AX-Expression auf $33,6\% \pm 15,7\%$ auf (Tab. 4). Diese war sowohl gegenüber den sporadischen Adenomen als den Kontrollen und entzündungsassoziierten Kollektiven hoch signifikant ($p<0,001$). Besonders hervorzuheben ist, dass das Level der γ -H2AX-Expression außerdem signifikant über dem der Colitis-assoziierten Karzinome lag ($p<0,001$), was daraufhin weist, dass es bei der Colitis-assoziierten Karzinogenese zu einer geringeren Aktivierung von H2AX kommt (Abb. 13). Bei Betrachtung des **Stadiums des**

Primärtumors (T-Stadium) zeigte sich ein kontinuierlicher, nicht signifikanter Anstieg des γ -H2AX-Levels mit Erhöhung des Stadiums ($p=0,649$) (Tab. 8). Eine konsistente Korrelation der γ -H2AX-Expression mit dem Ausmaß **regionärer Lymphknotenmetastasen** (N-Stadium) konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,523$). Bei Untersuchung des Einflusses von **Fernmetastasen** (M-Stadium) wies der eine Fall mit Metastase, gegenüber der Gruppe ohne Metastasen eine signifikant erhöhte γ -H2AX-Expression auf ($p<0,001$). Das **UICC-Stadium** zeigte keinen kontinuierlichen Zusammenhang mit dem γ -H2AX-Level, auch wenn sich zwischen einzelnen Stadien signifikante Unterschiede ergaben ($p<0,001$). Die Betrachtung des **histologischen Differenzierungsgrades** (Grading) ließ eine tendenzielle Verringerung der γ -H2AX-Expression mit zunehmender Entdifferenzierung erkennen ($p=0,413$).

Zusammenfassend zeigte sich γ -H2AX sowohl in der Colitis-assoziierten Entzündung als auch in der Colitis-assoziierten Karzinogenese weniger stark erhöht als in der zum Vergleich herangezogenen Sigmadivertikulitis und insbesondere der sporadischen Karzinogenese. Das könnte darauf hinweisen, dass die Colitis-assoziierte Entzündung durch verminderte γ -H2AX-Aktivierung zu einer Maskierung von DNA-Schäden beiträgt (Abb. 14).

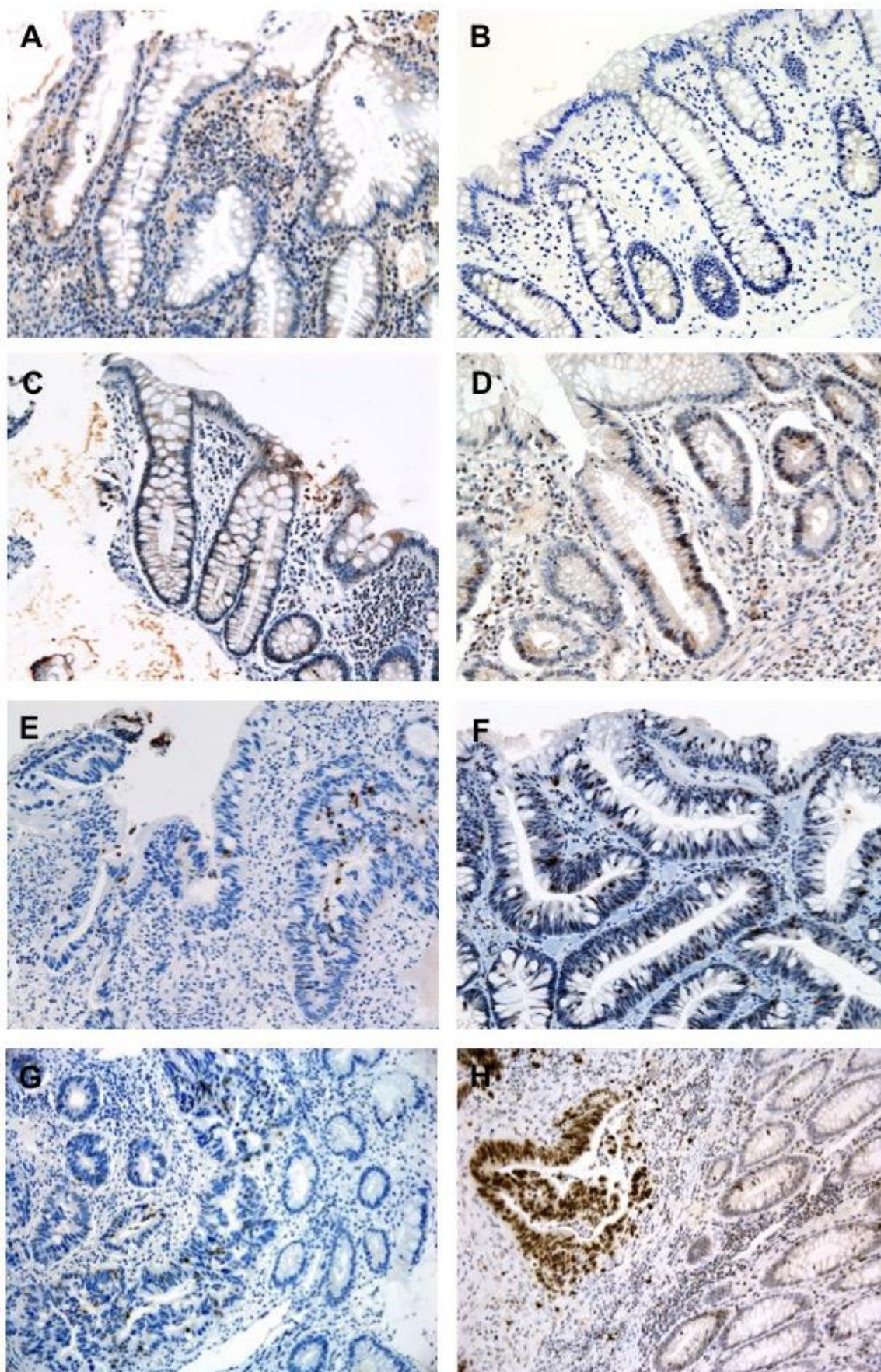


Abb. 13: Expression von γ -H2AX bei aktiver Colitis ulcerosa (A), Kontrollen (B), Remission (C), Divertikulitis (D), Colitis-assoziierten Dysplasien (E), sporadischen Adenomen (F), Colitis-assoziiertem Karzinom (G) und sporadischem kolorektalem Karzinom (H). (x200)

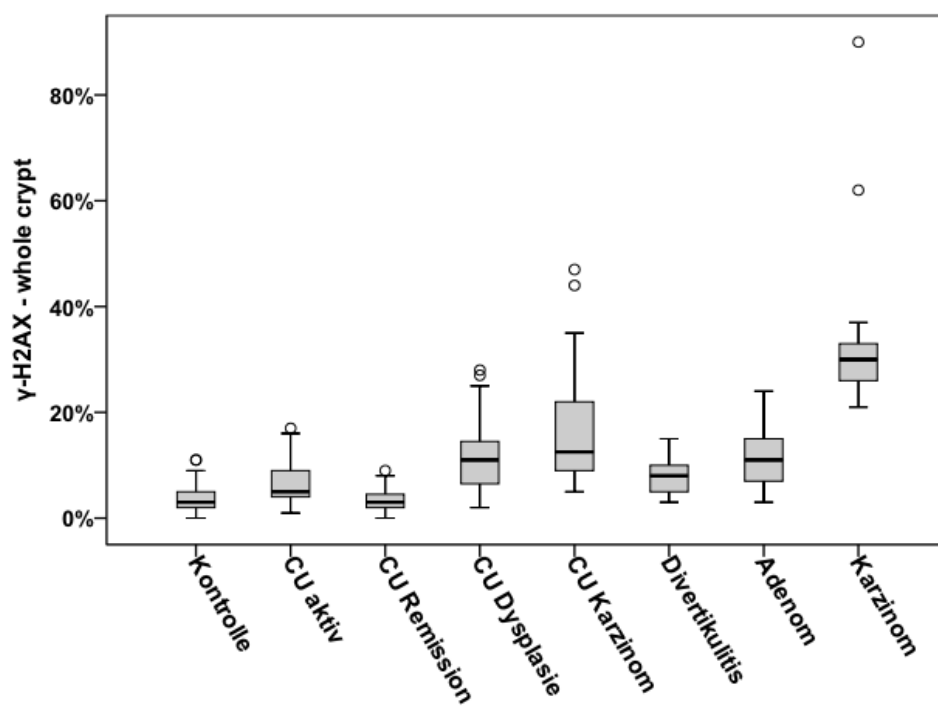


Abb. 14: Übersicht und Vergleich der γ -H2AX –Expression.

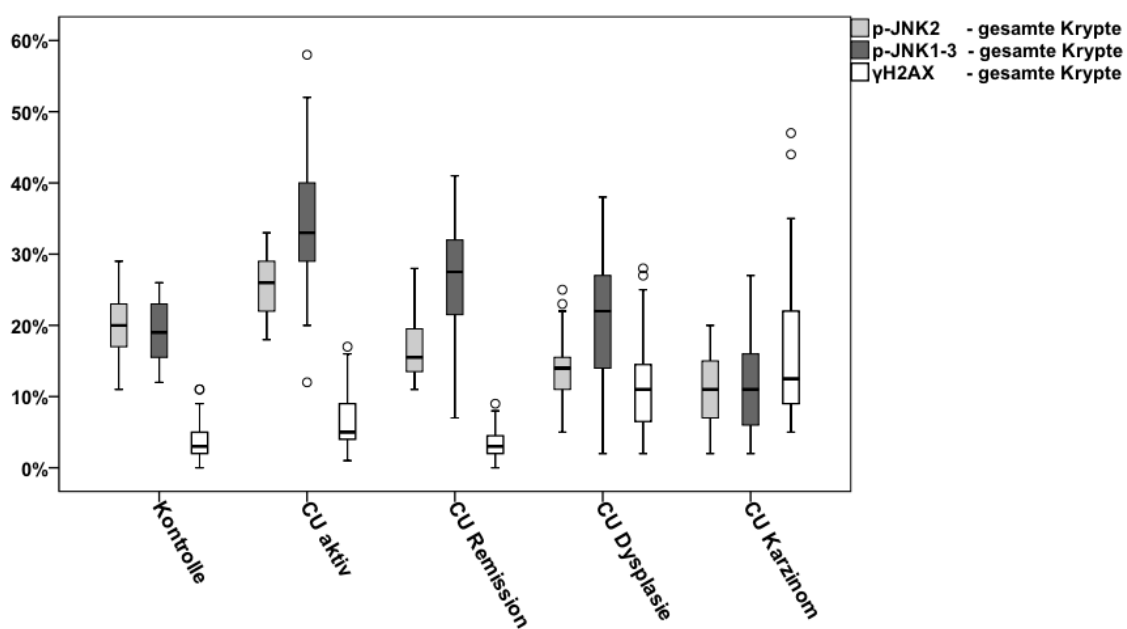


Abb. 15: Vergleich der p-JNK2-, p-JNK123- und γ -H2AX-Expression.

3.2.4 Expression von p21^{WAF1}

p21^{WAF1} zeigte in allen Kollektiven eine ausschließlich kräftige, nukleäre Expression, wobei nur die p21^{WAF1}-Expression im Kolonepithel gewertet wurde. Bei keinem der Kollektive ließ sich eine signifikante Korrelation der p21^{WAF1}-Expression mit dem Geschlecht, dem Patientenalter oder der Lokalisation des Gewebes im proximalen oder distalen Kolon nachweisen. Die detaillierten Expressionswerte zu p21^{WAF1} sind den Tabellen 10 bis 13 sowie 7 und 8 zu entnehmen.

3.2.4.1 Kontrollkollektiv

In der Mukosa der **Kontrollen** war eine deutliche zonale Verteilung der p21^{WAF1}-Expression innerhalb der Krypte zu beobachten (Tab. 10). Dabei war die p21^{WAF1}-Positivität im apikalen Kryptendrittel am höchsten (82,5%±9,5%), was damit übereinstimmt, dass sich hier unter Normalbedingungen die differenzierten, nicht mehr proliferierenden Zellen befinden. Nach basal war eine deutliche Abnahme der p21^{WAF1}-Expression mit 35,0%±14,0% im mittleren und 3,3%±4,4% im basalen Kryptendrittel zu verzeichnen. Die Grenze zwischen hoher und niedriger Expressionszone war scharf ausgebildet und fand sich meist im oberen Anteil des mittleren Kryptendrittels (Abb. 16).

3.2.4.2 Die p21^{WAF1}-Expression wird bei aktiver Colitis basal hoch- und bei Remission apikal herunterreguliert

Bei der **aktiven Colitis** war im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikanter Anstieg der Gesamt-p21^{WAF1}-Expression ($p=0,013$) sowie eine deutliche Verschiebung der zonalen p21^{WAF1}-Expression nach basal zu beobachten mit hier 16,2%±13,6% im unteren ($p<0,001$) und 49,2%±20,7% im mittleren Kryptendrittel ($p=0,001$) (Tab. 10). Im apikalen Kryptendrittel zeigte sich die p21^{WAF1}-Expression nahezu unverändert ($p=0,237$). Das zonale Verteilungsmuster blieb weiterhin bestehen. Die Grenze zwischen hoher und niedriger p21^{WAF1}-Expression verlor an Schärfe (Abb. 16). Die beobachteten Veränderungen könnten durch eine vermehrte Aktivierung von Zellzyklus-Kontroll-Punkten auch in proliferativ aktiven, basalen Kryptenabschnitten bei entzündlich bedingtem Zellstress erklärt werden. Passend dazu ließ sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Veränderungen der zonalen p21^{WAF1}-Expression mit einer Expressionszunahme im basalen Kryptendrittel und dem Schweregrad der **Entzündungsaktivität** erkennen ($p_{\text{Basal}}=0,125$, $p_{\text{Mitte}}=0,167$, $p_{\text{Apikal}}=0,412$) (Tab. 11).

Bei der Colitis in **Remission** normalisierte sich die p21^{WAF1}-Expression gegenüber der aktiven Colitis weitgehend (Tab. 10). Die Gesamt-p21^{WAF1}-Expression senkte sich ebenso wie die p21^{WAF1}-Expression im basalen und mittleren Kryptendrittel im Vergleich zu der aktiven Colitis signifikant ($p<0,001$) und lag nur wenig höher als die der Kontrollen

($p_{\text{MW}}=0,647$; $p_{\text{Basal}}=0,945$; $p_{\text{Mitte}}=0,994$). Auch das zonale Verteilungsmuster glich sich dem der Kontrollen an. Allerdings lag die $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression im apikalen Kryptendrittel deutlich unter jener der Kontrollen ($75,4\% \pm 16,5\%$ zu $82,5\% \pm 9,5\%$; $p=0,286$) (Abb. 16). Die Grenze zwischen den Expressionszonen blieb im Vergleich zu den Kontrollen leicht verwaschen. Die fortbestehenden Veränderungen der $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression könnten sowohl auf eine bei Regeneration kompensatorisch erhöhte Proliferation als auch auf eine beginnende Fehlregulation der Zellzyklus-Kontrolle zurückzuführen sein.

Es wurden die **Entzündungsaktivität** und **-chronizität** für das gesamte Kollektiv der Colitis-assoziierten Entzündungen untersucht (Tab. 11). Dabei zeigte sich mit steigender Aktivität eine signifikante Zunahme der Gesamt- $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression ($p<0,001$), die einer vorwiegend auf die beiden unteren Kryptendrittel bezogenen Expressionssteigerung geschuldet war. Ein gleichartiges Bild zeigte die $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression im Zusammenhang mit der Stärke der Entzündungschronizität. Auch hier stieg die Gesamt- $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression signifikant ($p=0,001$), was durch eine signifikante Expressionszunahme im basalen ($5,6\% \pm 5,2\%$ zu $16,2\% \pm 13,6\%$; $p<0,001$) und mittleren Kryptendrittel ($37,2\% \pm 17,0\%$ zu $49,2\% \pm 20,7\%$; $p<0,001$) von fehlender oder geringer zu mäßiger oder starker Chronizität bedingt war. Zusammenfassend fand sich bei einer stärkeren Entzündung eine vorwiegend an der Kryptenbasis erhöhte $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression, passend zu einem vermehrtem Zellzyklus-Arrest bei Zellstress und eventuellem DNA-Schaden.

Bei der **Divertikulitis** lag die $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression mit $26,6\% \pm 14,1\%$ im Durchschnitt signifikant unter der mittleren $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression der Kontrollen ($p<0,001$) (Tab. 10). Dabei bestanden die Unterschiede in einer leicht erhöhten Expression um $3,4\%$ in der Kryptenbasis ($6,7\% \pm 6,6\%$; $p=0,877$) bei deutlicher Reduktion in der Kryptenmitte um 11% ($23,6\% \pm 21,2\%$; $p=0,108$) und signifikanter Verminderung im apikalen Kryptendrittel um 33% ($49,5\% \pm 27,5\%$; $p<0,001$) (Abb. 16). Das $p21^{\text{WAF1}}$ -Expressionsmuster der Divertikulitis unterschied sich somit signifikant von dem der aktiven Colitis ($p_{\text{Basal}}=0,005$; p_{Mitte} , p_{Apikal} , p_{MW} je $<0,001$). Nennenswerte Veränderungen der $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression in Korrelation mit der **Entzündungsaktivität** ließen sich nicht nachweisen ($p_{\text{MW}}=0,254$) (Tab. 11). Gleiches galt für die **Entzündungschronizität** ($p_{\text{MW}}=0,622$) (Tab. 11).

3.2.4.3 Reduktion der $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression und Verlust der zonalen Verteilung bei der Colitis-assoziierten und der sporadischen Karzinogenese

Bei der **Colitis-assoziierten Dysplasie** zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine starke Verminderung der Gesamt- $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression auf $33,7\% \pm 12,7\%$ ($p=0,004$) (Tab. 10). Zudem war eine angedeutete Aufhebung der zonalen Gliederung mit Erhöhung der $p21^{\text{WAF1}}$ -Expression in der Kryptenbasis um $12,1\%$ ($15,4\% \pm 13,6\%$; $p<0,001$) und erheblicher

Abnahme im apikalen Kryptendrittel um 26,4% ($56,1\% \pm 17,0\%$; $p < 0,001$) zu beobachten (Abb. 16). Diese Veränderungen setzten die bei der Remission bereits angedeutet nachweisbaren Verschiebungen fort. Dabei war sowohl die Zunahme der basalen p21^{WAF1}-Expression als auch die Abnahme der apikalen Expression gegenüber der Remission signifikant verstärkt ($p < 0,001$). Beim Vergleich der mittleren Gesamt-Expression beider Kollektive fand sich lediglich eine tendenzielle Abnahme bei den Dysplasien auf $33,7\% \pm 12,7\%$ ($p = 0,022$) (Tab. 10). Diese Veränderungen könnten auf eine zunehmende Dysregulation der Zellzyklus-Kontrolle hinweisen. Ein konsistenter Zusammenhang der p21^{WAF1}-Expression mit dem **Grad der intraepithelialen Neoplasie** ließ sich nicht erkennen ($p_{\text{MW}} = 0,647$) (Tab. 12).

Die **Colitis-assoziierten Karzinome** zeigten im Vergleich zu den Colitis-assoziierten Dysplasien einen weiteren signifikanten Abfall der p21^{WAF1}-Expression auf durchschnittlich $22,6\% \pm 12,8\%$ ($p < 0,001$) (Tab. 10; Abb. 16). Da Karzinome naturgemäß nicht über eine erhaltene Kryptenarchitektur verfügen, war die Beurteilung der **zonalen Verteilung** der p21^{WAF1}-Expression, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde (siehe Kap. 2.2.4 in Material und Methoden) von untergeordneter Bedeutung. Es war hier insgesamt eine Abnahme der p21^{WAF1}-Expression zur Tumortiefe erkennbar (Tab. 7). Es wurde ein statistischer Zusammenhang mit dem Tumorstadium untersucht (Tab. 7). Bezüglich der **Ausbreitung des Primärtumors** (T-Stadium) fand sich von T1 zu T4 ein leichtes Absinken der Gesamt-p21^{WAF1}-Expression ($p_{\text{MW}} = 0,964$). Das Ausmaß der **regionären Lymphknotenmetastasen** (N-Stadium) ließ keinen linearen Zusammenhang mit der p21^{WAF1}-Expression erkennen ($p_{\text{MW}} = 0,120$). Bei den Fällen mit **Fernmetastasen** zeigte sich eine geringfügig höhere p21^{WAF1}-Expression verglichen mit den Fällen ohne Fernmetastasen ($p_{\text{MW}} = 0,581$). Bei Untersuchung des Einflusses des **UICC-Stadiums** fand sich keine lineare Veränderung der p21^{WAF1}-Expression ($p_{\text{MW}} = 0,202$). Bei Betrachtung des **histologischen Differenzierungsgrades** (Grading) fiel ein nicht signifikanter Anstieg der p21^{WAF1}-Expression mit steigender Entdifferenzierung auf ($p_{\text{MW}} = 0,447$).

Bei den sporadischen **Adenomen** zeigte sich eine zu den Colitis-assoziierten Dysplasien nahezu identische p21^{WAF1}-Expression ($p_{\text{MW}} = 0,339$) (Tab. 12). Auch hier war verglichen mit den Kontrollen ein signifikanter Expressionsanstieg an der Kryptenbasis ($14,5\% \pm 16,3\%$, $p = 0,006$) und eine Verminderung im mittleren ($24,3\% \pm 18,8\%$; $p = 0,144$) und vor allem apikalen Kryptendrittel ($52,8\% \pm 15,4\%$, $p < 0,001$) bei deutlich reduzierter p21^{WAF1}-Gesamt-Expression ($30,5\% \pm 12,9\%$, $p = 0,001$) zu erkennen. Die zonale Verteilung schien nahezu aufgehoben (Abb. 16). Nach Untersuchung des statistischen Zusammenhangs der p21^{WAF1}-Expression mit dem Grad der **intraepithelialen Neoplasie** war insgesamt ein statistisch

nicht signifikanter Anstieg der p21^{WAF1}-Expression von der low-grade zur high-grade intraepithelialen Neoplasie um durchschnittlich 5,5% zu verzeichnen ($p_{\text{MW}}=0,693$) (Tab. 12). Ein Zusammenhang der p21^{WAF1}-Expression mit dem histologischen Adenom-Typ ließ sich nicht nachweisen ($p_{\text{MW}}=0,680$) (Tab. 12).

Bei den **sporadischen Karzinomen** stieg die mittlere p21^{WAF1}-Expression im Vergleich zu den Adenomen geringfügig an ($35,2\% \pm 11,4$ $p_{\text{MW}}=0,225$) und war verglichen mit den Colitis-assoziierten Karzinomen sogar signifikant um 12,6% erhöht ($p=0,001$) (Tab. 10). Das durchschnittliche p21^{WAF1}-Level lag jedoch 5,1% unter dem der Kontrollen ($p=0,459$) (Abb. 16). Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der mittleren p21^{WAF1}-Expression und dem Tumorstadium ergab für die **Ausbreitung des Primärtumors** (T-Stadium) eine leichte Reduktion der Expression bei zunehmendem Stadium ($p_{\text{MW}}=0,477$) (Tab. 8). Für das Ausmaß **regionärer Lymphknotenmetastasen** (N-Stadium) war kein Zusammenhang nachweisbar ($p_{\text{MW}}=0,775$). Der eine Fall mit **Fernmetastasen** zeigte eine deutlich gesteigerte p21^{WAF1}-Expression im Vergleich zu den Fällen ohne Fernmetastasen. Auch für das **UICC-Stadium** ließ sich kein konsistenter Einfluss auf die p21^{WAF1}-Expression erkennen ($p_{\text{MW}}=0,772$). Bezüglich des **histologischen Differenzierungsgrades** zeichnete sich mit steigender Entdifferenzierung eine Abnahme des p21^{WAF1}-Levels ab ($p_{\text{MW}}=0,113$).

Zusammenfassend ließ sich eine signifikante p21^{WAF1}-Erhöhung bei aktiver Colitis und eine signifikante p21^{WAF1}-Reduktion sowohl bei der Colitis-assoziierten als auch bei der sporadischen Karzinogenese beobachten. Dabei waren die Veränderungen bei den Colitis-assoziierten Karzinomen stärker ausgeprägt. Insgesamt entwickelt sich die p21^{WAF1}-Expression somit parallel zur Expression von p-JNK2 (Abb. 17-21).

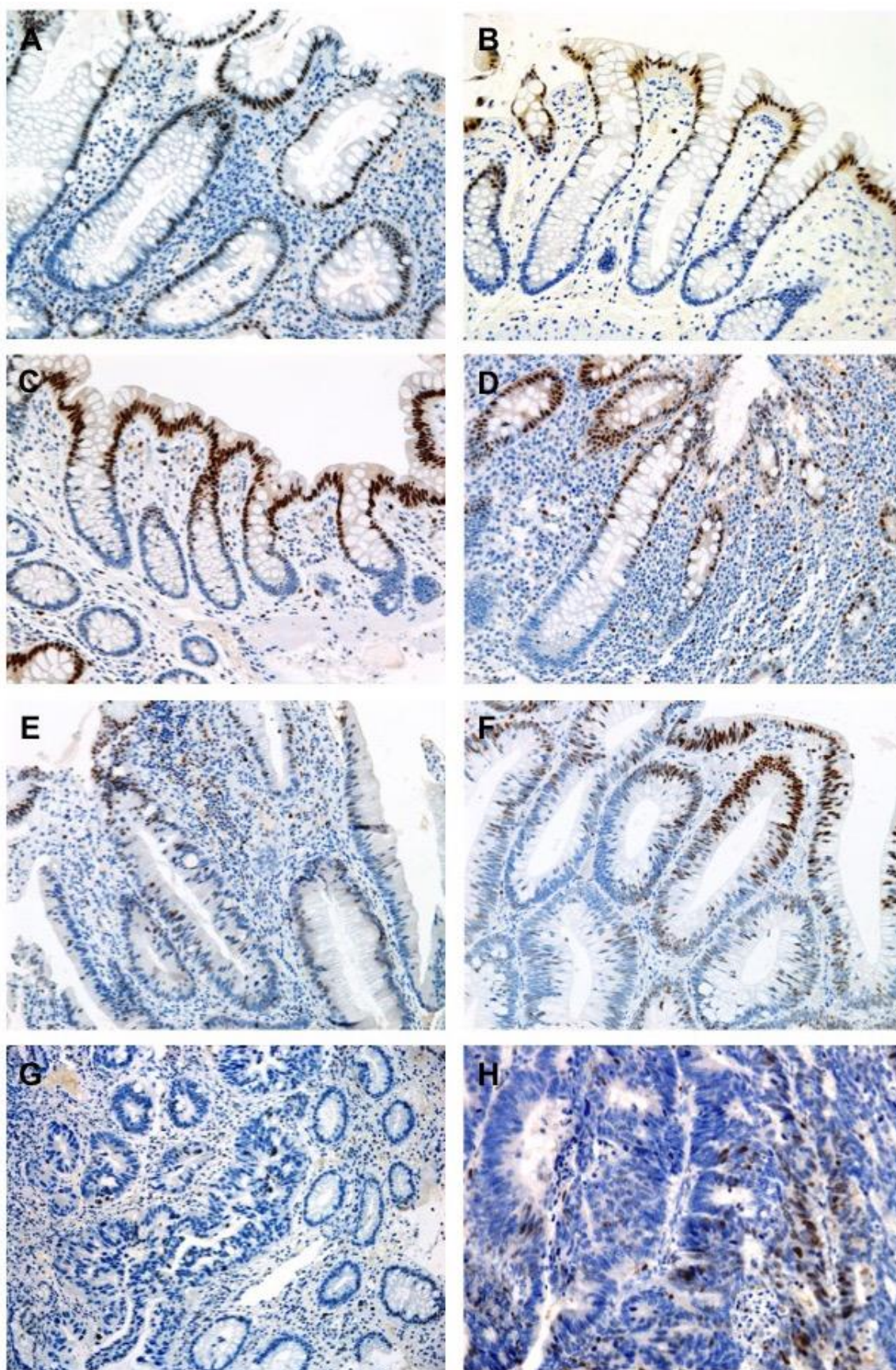


Abb. 16: Expression von p21^{WAF1} bei aktiver Colitis (A), Kontrollen (B), Remission (C), Divertikulitis (D), Colitis-assoziierten Dysplasien (E), sporadischen Adenomen (F), Colitis-assoziiertem Karzinom (G) und sporadischem kolorektalem Karzinom (H). (x200)

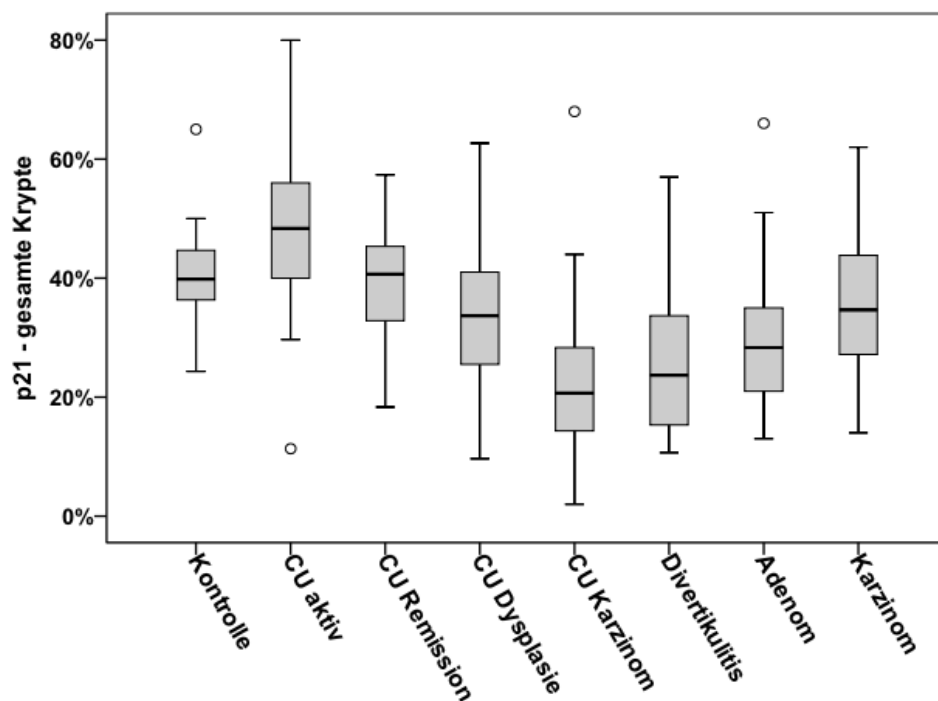


Abb. 17: Vergleich der mittleren p21^{WAF1}-Expression zwischen den Kohorten.

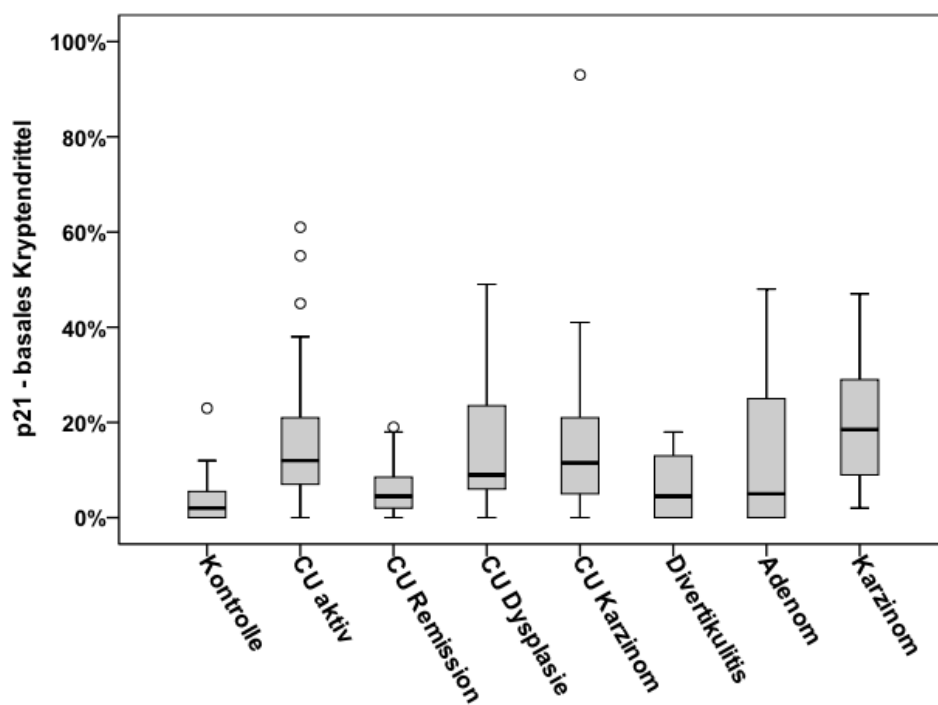


Abb. 18: Vergleich der p21^{WAF1}-Expression im basalen Kryptendrittel zwischen den Kohorten.

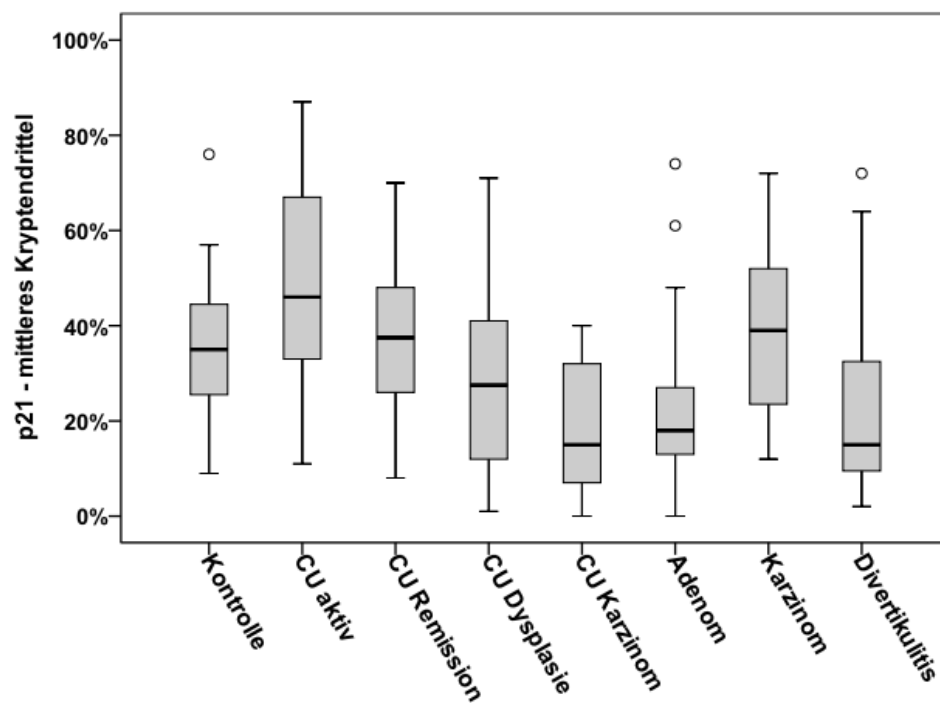


Abb. 19: Vergleich der p21^{WAF1}-Expression im mittleren Kryptendrittel zwischen den Kohorten.

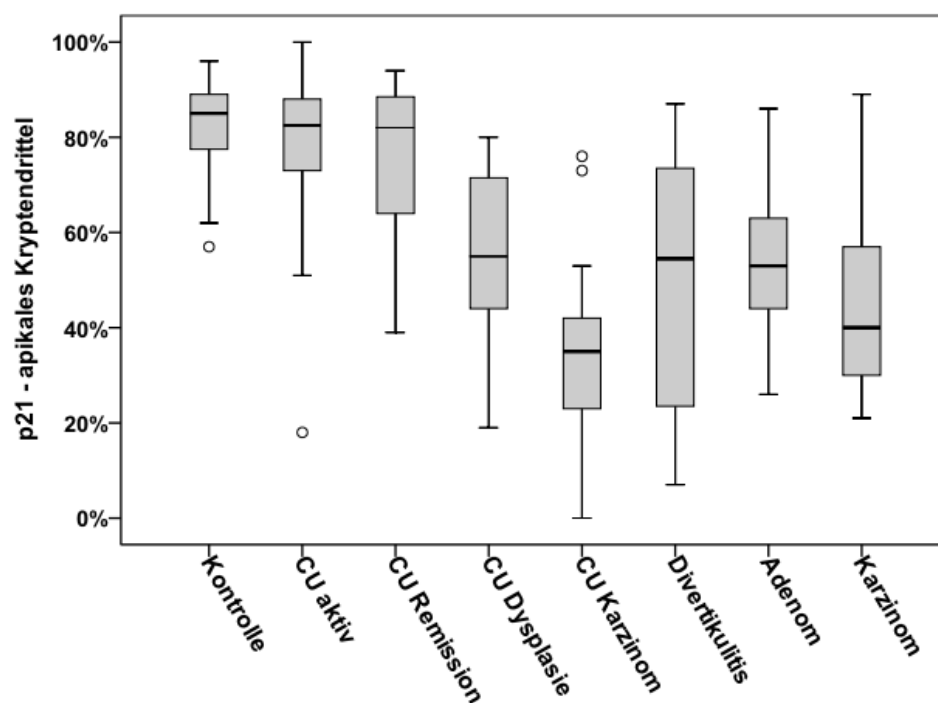


Abb. 20: Vergleich der p21^{WAF1}-Expression im apikalen Kryptendrittel zwischen den Kohorten.

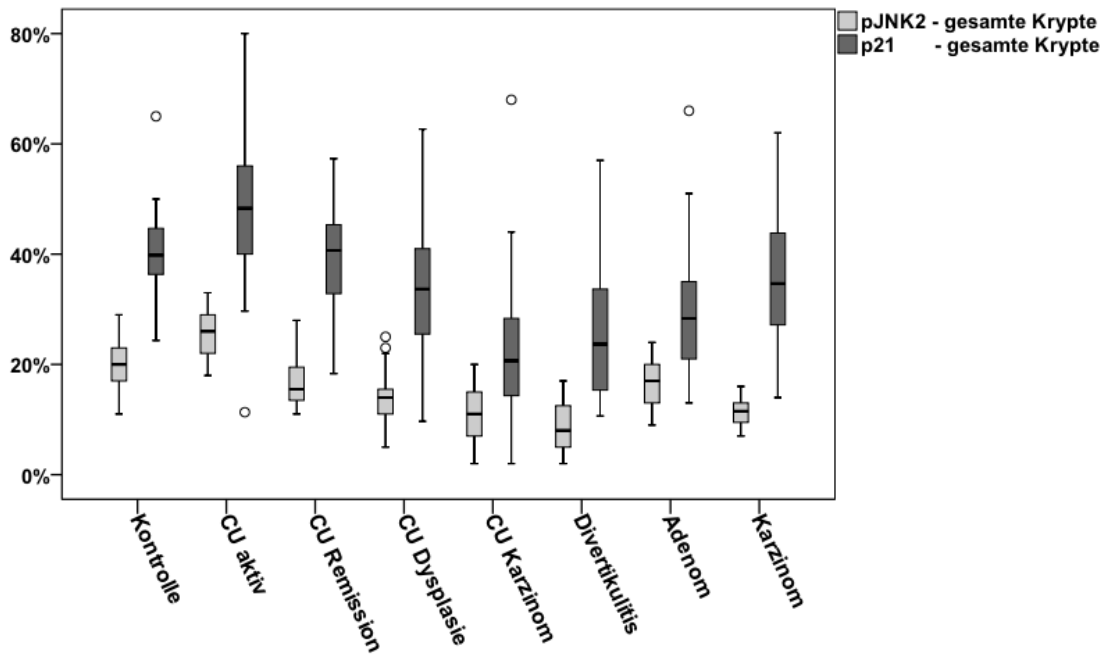


Abb. 21: Vergleich der pJNK2-Expression und der mittleren p21^{WAF1}-Expression.

3.2.5 Expression von Ki67

Ki67 wurde in allen Kollektiven kräftig und nukleär exprimiert. Gewertet wurde ausschließlich die Expression innerhalb des Kolonepithels. Bei keinem der Kollektive ließ sich eine signifikante Korrelation der Ki67-Expression mit dem Geschlecht, dem Patientenalter oder der Lokalisation des Gewebes im proximalen oder distalen Kolon nachweisen. Die detaillierten Expressionswerte zu Ki67 finden sich in Tabelle 10 bis 13 sowie 7 und 8.

3.2.5.1 Kontrollkollektiv

In der entzündungs- und dysplasiefreien Mukosa der **Kontrollen** war eine deutliche zonale Ki67-Expression innerhalb der Krypten entsprechend den Proliferations- und Differenzierungszone zu beobachten, die sich nahezu spiegelbildlich zur p21^{WAF1}-Expression verhielt (Tab. 10). So zeigte sich eine vorwiegend in der Kryptenbasis lokalisierte Ki67-Positivität (58,1%±12,9%), die nach apikal stark abnahm (Abb. 22). Im oberen Kryptendrittel und dem Oberflächenepithel fanden sich lediglich vereinzelt Ki67-exprimierende Zellen (1,9%± 3,9%). Die Grenze zwischen hoher und niedriger Expressionszone war scharf ausgebildet und meist im unteren Anteil des mittleren Kryptendrittels lokalisiert.

3.2.5.2 Anstieg der Ki67-Expression bei aktiver Colitis und bei Remission

Bei der **aktiven Colitis** war die Gesamt-Ki67-Rate im Vergleich zu den Kontrollen signifikant von 30,6%±7,8% auf 49,7%±9,9% erhöht ($p < 0,001$) (Tab. 10). Der Anteil Ki67-positiver Zellen stieg vor allem im mittleren und apikalen Kryptendrittel signifikant ($p < 0,001$). Das zonale Verteilungsmuster blieb aber erhalten. Die Grenze zwischen hoher und niedriger Ki67-Rate erschien leicht verwaschen (Abb. 22). Ein linearer Zusammenhang der Ki67-Expression mit dem Schweregrad der **Entzündungsaktivität** war nicht darstellbar ($p_{MW} = 0,700$) (Tab. 11).

Bei der Colitis in **Remission** war analog zur p21^{WAF1}-Expression eine partielle Normalisierung der Ki67-Rate gegenüber der aktiven Colitis zu erkennen (Tab. 10). So nahm die Ki67-Positivität signifikant um durchschnittlich 12% ab ($p < 0,001$) und reduzierte sich vor allem im mittleren und apikalen Kryptendrittel ($p < 0,001$). Sie lag hier jedoch weiter über der Ki67-Rate der Kontrollen ($p_{Mitte} = 0,060$; $p_{Apikal} = 0,350$) (Abb. 22). Die Grenze zwischen den Expressionszonen erschien weiterhin leicht verwaschen.

Wie für die p21^{WAF1}-Expression dargestellt, wurde zur Beurteilung des Verhältnisses der Ki67-Expression zur **Entzündungsaktivität und -chronizität** das gesamte Kollektiv der Colitis-assoziierten Entzündungen untersucht (Tab. 11). Für die Aktivität zeigte sich über alle Kryptenabschnitte ein mit der Entzündungsstärke korrelierender Anstieg der Ki67-Rate um

durchschnittlich 10,7% ($p < 0,001$). Eine gleichartige Korrelation zeigte die Ki67-Expression mit dem Ausmaß der Entzündungschronizität ebenfalls über die ganze Krypte. Die Steigerung lag hier bei durchschnittlich 12,1% ($p < 0,001$).

Bei der **Divertikulitis** stellte sich verglichen mit den Kontrollen nur eine minimale Erhöhung der Ki67-Rate dar ($p_{\text{MW}} = 0,687$) (Tab. 10). Auch hier fand sich die Erhöhung der Expression vorwiegend im apikalen Kryptendrittel ($p_{\text{Apikal}} = 0,009$) (Abb. 22). Die Veränderungen waren insgesamt signifikant schwächer ausgeprägt als bei der aktiven Colitis ($p_{\text{MW}} < 0,001$). Mit steigender **Entzündungsaktivität** fand sich im basalen und apikalen Kryptendrittel ein leichter Anstieg der Ki67-Rate um durchschnittlich 8,4% ($p_{\text{MW}} = 0,254$) (Tab. 11). Bei Betrachtung der **Entzündungschronizität** war lediglich ein Anstieg der Ki67-Rate im basalen und mittleren Kryptendrittel sowie der mittleren Gesamt-Ki67-Rate zu verzeichnen (Tab. 11). Apikal sank die Ki67-Expression leicht. Weder die Veränderung der Gesamt- noch die der zonalen Ki67-Expression war signifikant ($p_{\text{MW}} = 0,622$).

3.2.5.3 Erhöhung der Ki67-Expression und Verlust der zonalen Verteilung während der Colitis-assoziierten und der sporadischen Karzinogenese

Bei den **Colitis-assoziierten Dysplasien** zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Erhöhung der mittleren Gesamt-Ki67-Rate um 14,2% auf $44,9\% \pm 13,2\%$ ($p < 0,001$) (Tab. 10). Diese war einer weitgehenden Aufhebung der zonalen Gliederung mit deutlicher Zunahme der Ki67-Rate im apikalen Kryptendrittel von $2,0\% \pm 3,9\%$ auf $32,4\% \pm 21,0\%$ ($p < 0,001$) und leichter Abnahme der Ki67-Rate im basalen Kryptendrittel von $58,1\% \pm 12,9\%$ auf $52,8\% \pm 19,4\%$ ($p = 0,138$) geschuldet (Abb. 22). Verglichen mit der aktiven Colitis war das Ki67-Level im apikalen Kryptendrittel signifikant erhöht ($p < 0,001$) und basal signifikant reduziert ($p < 0,001$). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Ki67-Expression mit dem **Grad der intraepithelialen Neoplasie** ließ sich nicht nachweisen (Tab. 12), wobei die high-grade intraepithelialen Neoplasien eine minimale Ki67-Erhöhung um durchschnittlich 1,7% zeigten ($p_{\text{MW}} = 0,647$).

Die **Colitis-assoziierten Karzinome** zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine aufgehobene Kryptenarchitektur mit einer um 16,1% erhöhten Gesamt-Ki67-Rate von $46,8\% \pm 14,1\%$ ($p < 0,001$) (Tab. 10). Das Ki67-Level lag somit leicht über dem der Colitis-assoziierten Dysplasien ($p_{\text{MW}} = 0,174$). Der Anteil Ki67-positiver Zellen war jedoch mit durchschnittlich $46,8\% \pm 14,1\%$ nicht höher als die durchschnittliche Ki67-Rate der aktiven Colitis mit $49,7\% \pm 9,9\%$ (Abb. 22). Es wurde der statistische Zusammenhang der Ki67-Expression mit dem Tumorstadium untersucht (Tab. 7). Dabei war bezüglich der **Ausbreitung des Primärtumors** (T-Stadium) kein konsistenter Zusammenhang darstellbar ($p_{\text{MW}} = 0,364$). Dieses Ergebnis fand sich auch bei Betrachtung der **regionären**

Lymphknotenmetastasen (N-Stadium) ($p_{MW}=0,164$). Das Vorhandensein von **Fernmetastasen** war mit einer verminderten Ki67-Rate assoziiert ($p_{MW}=0,060$). Bei der Untersuchung des **UICC-Stadiums** ließ sich kein Zusammenhang mit der Ki67-Expression nachweisen ($p_{MW}=0,202$). Für den **histologischen Differenzierungsgrad** kam eine leichte Reduktion der Ki67-Rate zur Darstellung ($p_{MW}=0,447$).

Bei den sporadischen **Adenomen** war verglichen mit den Kontrollen eine weitgehende Aufhebung des zonalen Verteilungsmusters der Ki67-Expression mit deutlicher, apikaler Zunahme der Rate ($48,2\% \pm 21,7\%$; $p < 0,001$) zu beobachten (Tab. 10). Auch hier war die mittlere Gesamt-Ki67-Rate gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht ($41,5\% \pm 12,8\%$; $p_{MW}=0,001$) (Abb. 22). Eine lineare Korrelation der Ki67-Expression mit dem **Grad der intraepithelialen Neoplasie** war nicht zu erkennen ($p_{MW}=0,547$) (Tab. 12). Gleiches galt für den histologischen **Adenom-Typ** ($p_{MW}=0,800$) (Tab. 12).

Bei den **sporadischen Karzinomen** war, verglichen mit den sporadischen Adenomen eine weitere Erhöhung der mittleren Ki67-Rate auf $54,8\% \pm 13,7\%$ zu verzeichnen ($p_{MW}=0,003$) (Tab. 10). Die Ki67-Expression war dabei weitgehend gleichmäßig über die verschiedenen Tumorareale verteilt. Der Anstieg der Ki67-Rate zeigte sich gegenüber den Kontrollen statistisch hoch signifikant ($p_{MW} < 0,001$). Im Vergleich zu den Colitis-assoziierten Karzinomen wiesen die sporadischen Karzinome eine 8% höhere Gesamt-Ki67-Rate auf ($p_{MW}=0,055$) (Abb. 22). Es wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Ki67-Expression und dem Tumorstadium besteht (Tab. 8). Dabei zeichnete sich mit zunehmender **Ausbreitung des Primärtumors** (T-Stadium) ein tendenzieller Abfall der Ki67-Rate ab ($p_{MW}=0,500$). Das Ausmaß **regionärer Lymphknotenmetastasen** (N-Stadium) ließ keinen linearen Einfluss auf die Ki67-Expression erkennen ($p=0,486$). Dies galt auch für das Vorhandensein von **Fernmetastasen** ($p_{MW}=0,660$). Bei der Untersuchung des **UICC-Stadiums** war ebenfalls kein konsistenter Zusammenhang mit der Ki67-Expression nachweisbar ($p_{MW}=0,962$). Der **histologische Differenzierungsgrad** ging mit einem leichten Anstieg der mittleren Gesamt-Ki67-Rate bei zunehmender Entdifferenzierung einher ($p_{MW}=0,482$).

Zusammenfassend ließ sich eine starke Zunahme der Ki67-Rate bei aktiver Colitis verglichen mit den Kontrollen beobachten, womit sich Ki67 parallel zu $p21^{WAF1}$ entwickelte. Bei Remission sank der Ki67-Index wieder, eine vollständige Normalisierung war jedoch nicht zu verzeichnen. Passend zu einer gesteigerten Proliferation nahm Ki67 sowohl bei der Colitis assoziierten als auch bei sporadischen Karzinogenese zu und zeigte somit eine inverse Entwicklung zu $p21^{WAF1}$ (Abb. 23-27).

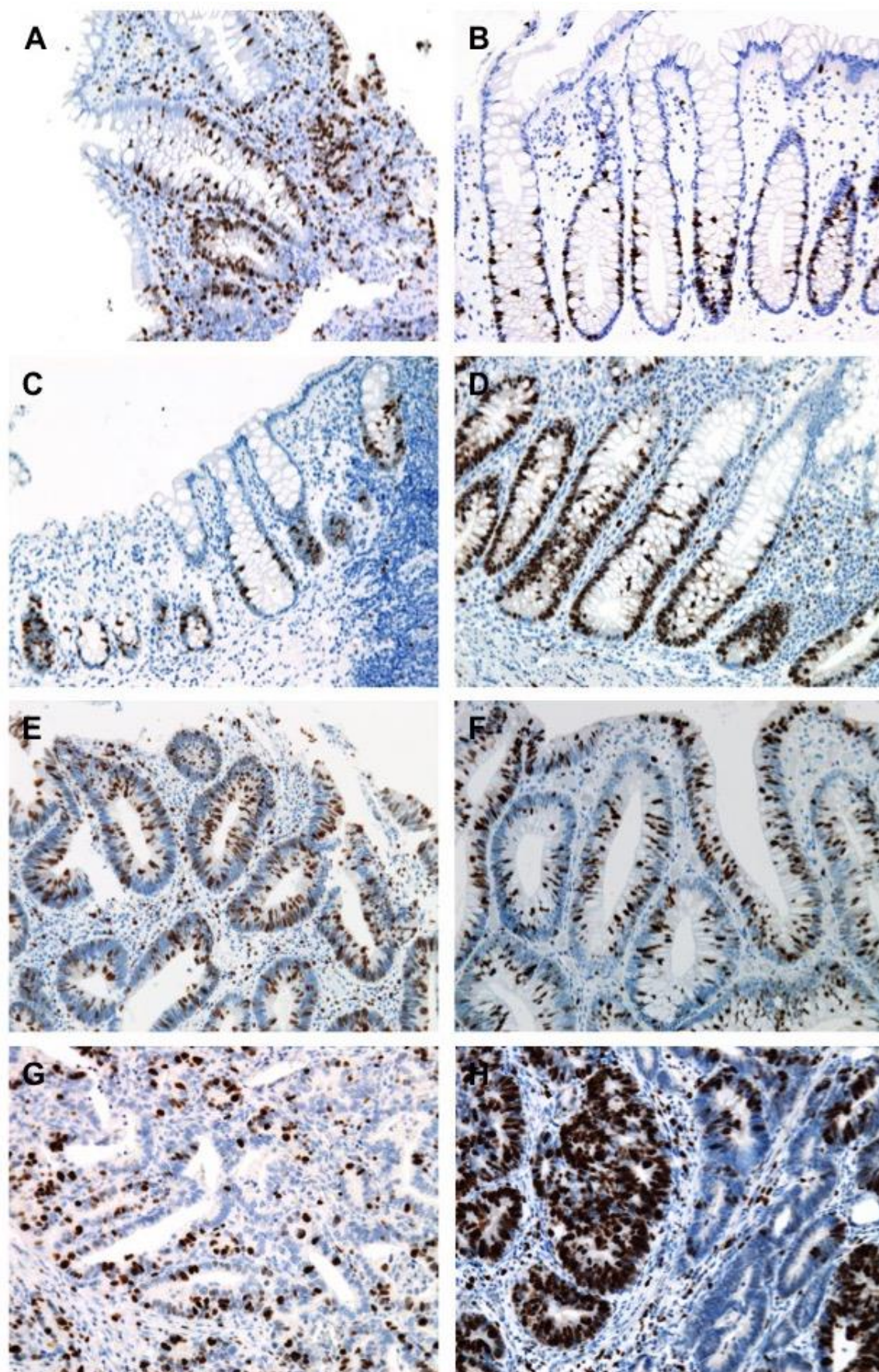


Abb. 22: Expression von Ki67 bei aktiver Colitis (A), Kontrollen (B), Remission (C), Divertikulitis (D), Colitis-assoziierten Dysplasien (E), sporadischen Adenomen (F), Colitis-assoziiertem Karzinom (G) und sporadischem kolorektalem Karzinom (H). (x200)

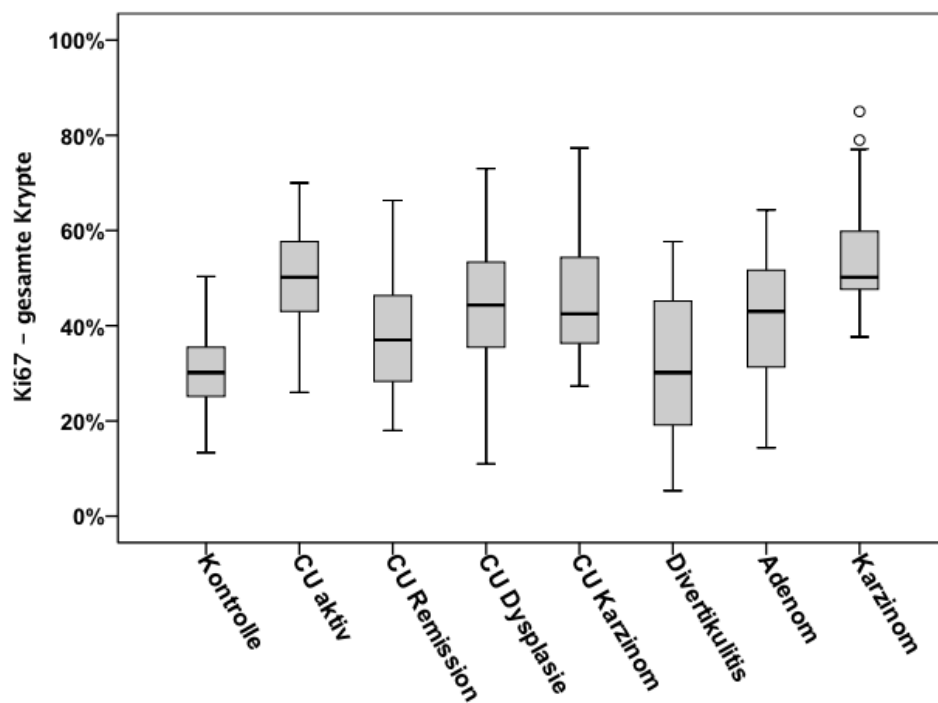


Abb. 23: Vergleich der mittleren Ki67-Expression zwischen den Kohorten.

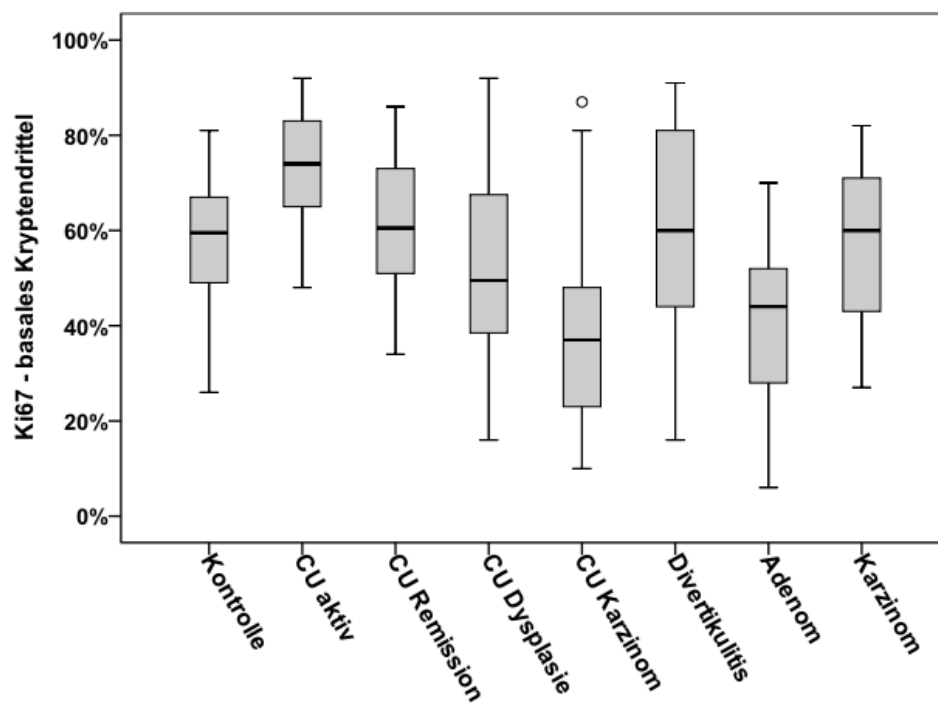


Abb. 24: Vergleich der Ki67-Expression im basalen Kryptendrittel zwischen den Kohorten.

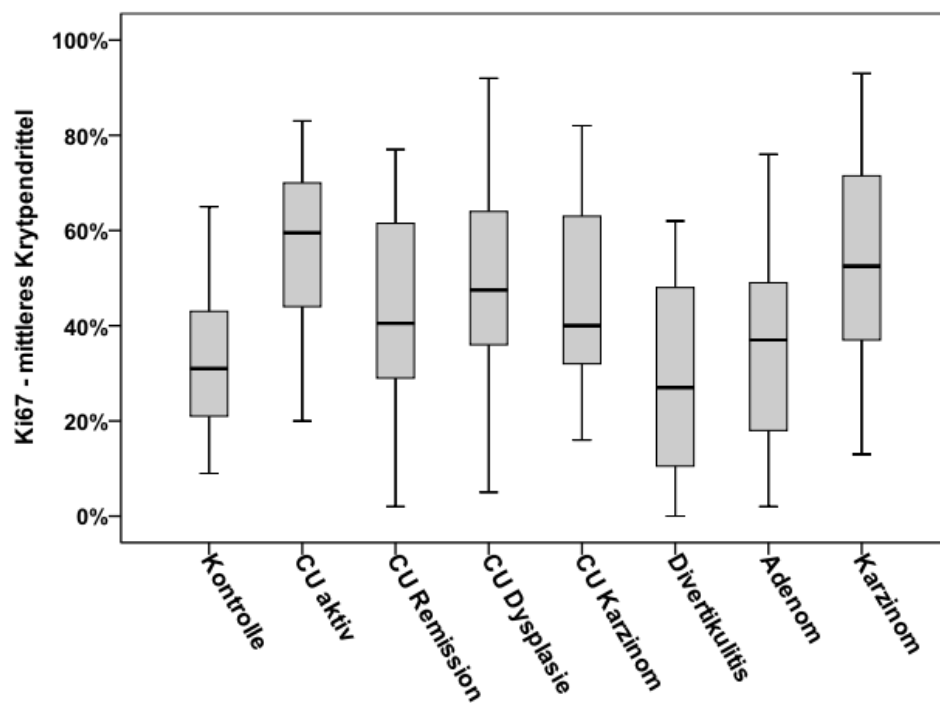


Abb. 25: Vergleich der Ki67-Expression im mittleren Kryptendrittel zwischen den Kohorten.

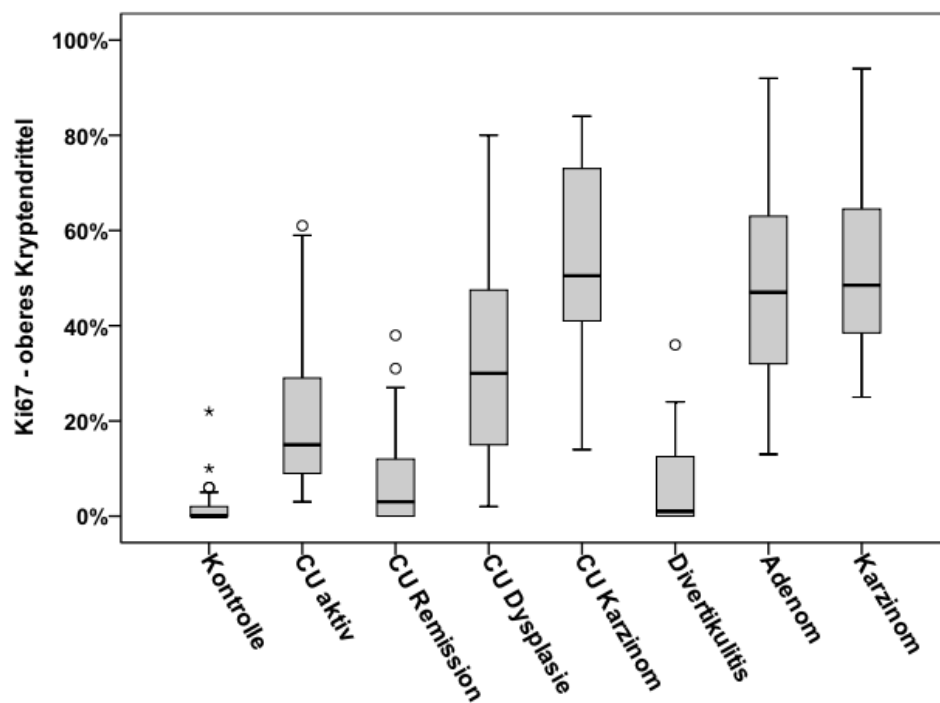


Abb. 26: Vergleich der Ki67-Expression im apikalen Kryptendrittel zwischen den Kohorten.

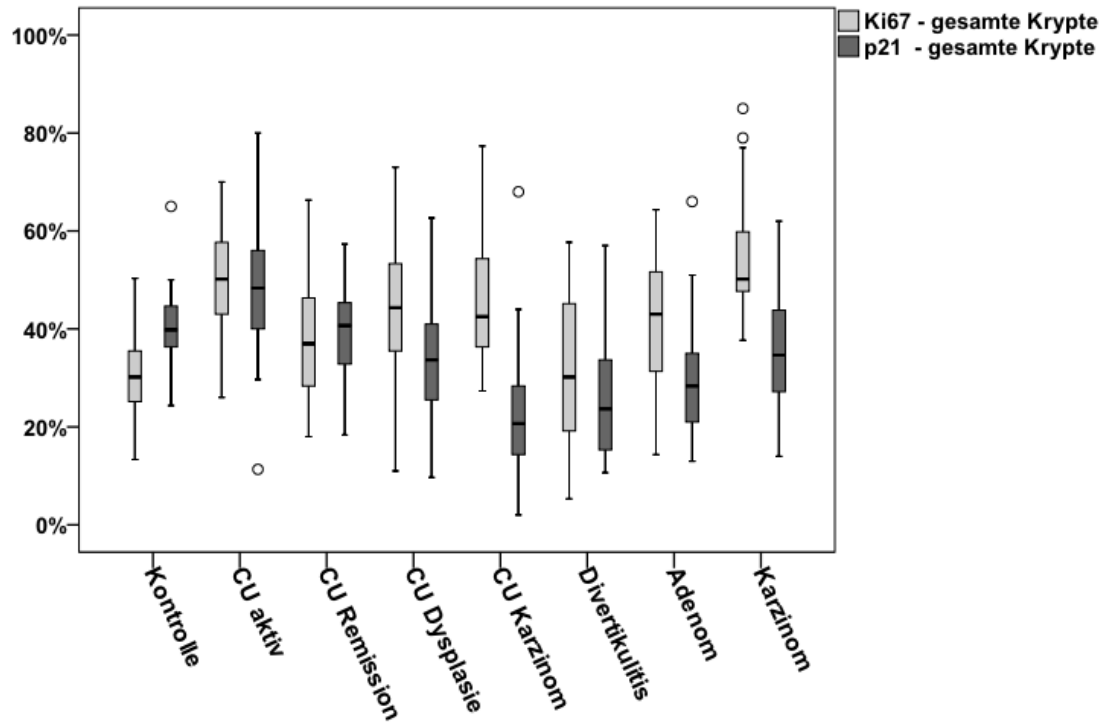


Abb. 27: Gegenüberstellung der Gesamt-p21^{WAF1}- und Gesamt-Ki67-Expression.

Tab. 4: Durchschnittliche p-JNK2-, p-JNK123- und γ -H2AX-Expression pro Kollektiv. Die angegebenen p-Werte sind gegenüber der Expression der Kontrollkohorte gerechnet.

Gruppe	p-JNK2 MW \pm SD(%)	p-JNK123 MW \pm SD(%)	γ -H2AX MW \pm SD(%)
Kontrolle	20,6 \pm 4,4	19,1 \pm 4,1	3,7 \pm 2,8
aktive Colitis	25,4 \pm 4,2 p<0,001	34,1 \pm 9,3 p<0,001	6,6 \pm 4,0 p<0,001
Remission	16,8 \pm 4,4 p<0,001	26,6 \pm 6,9 p<0,001	3,3 \pm 2,4 p=0,551
CU-Dysplasie	13,6 \pm 4,4 p<0,001	21,0 \pm 8,7 p=0,220	11,5 \pm 6,3 p<0,001
CU-Karzinom	11,0 \pm 4,8 p<0,001	11,5 \pm 6,6 p<0,001	16,9 \pm 10,8 p<0,001
Divertikulitis	9,2 \pm 4,8 p<0,001	10,1 \pm 6,8 p<0,001	8,1 \pm 3,6 p<0,001
Adenom	16,4 \pm 4,5 p=0,001	18,4 \pm 7,3 p=0,866	10,9 \pm 5,3 p<0,001
Karzinom	11,5 \pm 2,7 p<0,001	14,7 \pm 10,7 p=0,026	33,6 \pm 15,7 p<0,001

MW \pm SD (%): Mittelwert in Prozent \pm Standardabweichung in Prozent.

Tab. 5: Korrelation der mittleren Gesamtexpression von p-JNK2, p-JNK123 und γ -H2AX mit Geschlecht (Sex), Lokalisation im proximalen oder distalen Kolon und der Entzündungsaktivität und -chronizität.

Gruppe		n	p-JNK2 MW (%)	p	p-JNK123 MW (%)	p	γ -H2AX MW (%)	p
Kontrolle								
Sex	männlich	16	21,0 \pm 4,3	0,667	18,5 \pm 4,6	0,499	3,9 \pm 2,8	0,686
	weiblich	24	20,4 \pm 4,6		19,4 \pm 3,9		3,5 \pm 2,9	
Lokalisation	proximal	15	21,9 \pm 5,1	0,172	19,1 \pm 4,4	0,985	4,6 \pm 3,2	0,100
	distal	25	19,9 \pm 3,9		19,0 \pm 4,1		3,1 \pm 2,5	
aktive Colitis*								
Sex	männlich	24	25,8 \pm 4,5	0,570	36,2 \pm 9,4	0,091	7,1 \pm 4,4	0,328
	weiblich	18	25,0 \pm 3,8		31,3 \pm 8,6		5,9 \pm 3,4	
Lokalisation	proximal	6	26,2 \pm 4,0	0,645	34,5 \pm 9,6	0,904	4,7 \pm 2,3	0,207
	distal	36	25,3 \pm 4,2		34,0 \pm 9,4		6,9 \pm 4,2	
Aktivität	keine/leicht	4	26,5 \pm 4,0	0,595	27,8 \pm 5,6	0,154	8,3 \pm 5,7	0,392
	mäßig/schwer	38	25,3 \pm 4,2		34,7 \pm 9,4		6,4 \pm 3,8	
Remission**								
Sex	männlich	23	16,4 \pm 3,1	0,602	27,3 \pm 6,8	0,435	3,7 \pm 2,9	0,179
	weiblich	17	17,2 \pm 5,8		25,6 \pm 7,2		2,7 \pm 1,3	
Lokalisation	proximal	16	18,4 \pm 5,2	0,054	26,6 \pm 8,7	0,978	3,8 \pm 2,5	0,273
	distal	24	15,7 \pm 3,4		26,6 \pm 5,7		3,0 \pm 2,3	
Gesamt Colitis Kollektiv***								
Aktivität	keine/leicht	44	17,6 \pm 5,2	<0,001	26,8 \pm 6,8	<0,001	3,8 \pm 3,1	0,001
	mäßig/schwer	38	25,3 \pm 4,2		34,8 \pm 9,4		6,4 \pm 3,9	
Chronizität	keine/leicht	40	16,8 \pm 4,4	<0,001	26,6 \pm 6,9	<0,001	3,3 \pm 2,4	<0,001
	mäßig/schwer	42	25,4 \pm 4,2		34,1 \pm 9,3		6,6 \pm 4,0	
Divertikulitis****								
Sex	männlich	13	9,6 \pm 5,7	0,572	10,8 \pm 6,6	0,563	8,4 \pm 3,6	0,587
	weiblich	7	8,3 \pm 2,8		8,9 \pm 7,5		7,4 \pm 3,8	
Aktivität	keine/leicht	10	9,3 \pm 4,9	0,894	12,8 \pm 5,4	0,075	7,6 \pm 3,1	0,592
	mäßig/schwer	10	9,0 \pm 5,1		7,4 \pm 7,2		8,5 \pm 4,2	
Chronizität	keine/leicht	4	10,3 \pm 5,6	0,624	12,3 \pm 6,7	0,495	7,5 \pm 1,7	0,744
	mäßig/schwer	16	8,9 \pm 4,8		9,6 \pm 7,0		8,2 \pm 4,0	

* Keine Differenzierung bezüglich Chronizität möglich, da bei aktiver Colitis nur Fälle mit mäßiger oder schwerer Chronizität vorliegen.

** Für die Remission ist keine Differenzierung bezüglich Aktivität und Chronizität möglich, da ausschließlich Fälle ohne oder mit geringer Aktivität bzw. Chronizität vorliegen.

*** Zusammenfassung der Kollektive der aktiven Colitis und der Remission.

**** Für die Divertikulitis ist keine Differenzierung bezüglich der Lokalisation möglich, da alle Fälle aus dem Sigma (distales Kolon) stammen.

Tab. 6: Korrelation der mittleren Gesamtexpression von p-JNK2, p-JNK123 und γ -H2AX mit Geschlecht (Sex), Lokalisation im proximalen oder distalen Kolon, dem histologischen Adenom-Typ (Typ) und dem Grad der intraepithelialen Neoplasie (IEN).

Gruppe		n	p-JNK2 MW (%)	p	p-JNK123 MW (%)	p	γ -H2AX MW (%)	p
CU Dysplasie								
Sex	männlich	41	13,6 \pm 4,4	0,810	21,3 \pm 8,8	0,542	11,4 \pm 6,3	0,788
	weiblich	11	13,3 \pm 4,2		19,5 \pm 8,1		12,0 \pm 6,7	
Lokalisation	proximal	11	14,4 \pm 4,7	0,496	21,5 \pm 9,2	0,808	10,2 \pm 6,0	0,427
	distal	41	13,3 \pm 4,3		20,7 \pm 8,6		11,9 \pm 6,4	
IEN	low-grade	31	13,9 \pm 4,7	0,647	21,1 \pm 9,0	0,389	10,1 \pm 4,5	0,021
	high-grade	21	13,0 \pm 3,9		20,6 \pm 8,3		13,6 \pm 7,9	
Adenom								
Sex	männlich	10	17,1 \pm 4,8	0,496	18,0 \pm 6,3	0,805	10,3 \pm 6,1	0,657
	weiblich	11	15,7 \pm 4,3		18,8 \pm 8,4		11,4 \pm 4,7	
Lokalisation	proximal	7	12,7 \pm 2,6	0,004	18,9 \pm 5,2	0,855	12,7 \pm 3,9	0,266
	distal	14	18,2 \pm 4,1		18,2 \pm 8,3		9,9 \pm 5,8	
Typ	tubulär	9	14,3 \pm 3,9	0,067	20,1 \pm 8,1	0,374	10,4 \pm 6,2	0,766
	tubulo-villös	12	17,9 \pm 4,4		17,2 \pm 6,7		11,2 \pm 4,8	
IEN	low-grade	10	17,4 \pm 4,1	0,331	18,4 \pm 5,5	0,987	9,8 \pm 5,1	0,397
	high-grade	11	15,5 \pm 4,8		18,5 \pm 8,9		11,8 \pm 5,5	

Tab. 7: Korrelation der Expression aller Marker mit dem Geschlecht (Sex), der Lokalisation (Lok.) im proximalen oder distalen Kolon, der Tumorausdehnung (pT), Lymphknotenmetastasen (pN), Fernmetastasen (pM), dem Tumorstadium (UICC) und dem Grading (G), bei Colitis-assoziiertem Karzinom.

CU Karzinom												
Gruppe		p-JNK2 MW (%)	p-JNK123 MW (%)	γ-H2AX MW (%)	p21 ^{WAF1} Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)	Ki67 Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)
Sex	männlich	10,3±4,5	11,6±6,6	17,0±12,1	16,4±21,6	18,8±12,7	37,4±19,5	24,2±14,3	41,9±23,2	47,9±20,1	59,1±18,0	49,6±13,7
	weiblich	12,4±5,4	11,4±7,0	16,9±8,1	18,8±12,7	16,1±14,3	26,0±13,2	19,3±9,1	37,4±17,6	42,1±18,2	44,4±19,6	41,3±14,0
		p=0,257	p=0,955	p=0,991	p=0,937	p=0,603	p=0,108	p=0,332	p=0,594	p=0,453	p=0,051	p=0,132
Lok	proximal	10,1±4,0	10,2±5,8	17,7±11,4	23,8±25,7	23,2±13,8	38,4±15,9	28,4±14,8	38,3±24,5	53,5±19,8	59,3±19,1	50,4±14,9
	distal	11,6±5,3	12,4±7,2	16,4±10,7	11,2±11,0	14,4±11,7	30,4±19,4	18,7±9,8	41,8±19,5	40,9±17,8	50,8±19,6	44,5±13,5
		p=0,422	p=0,378	p=0,767	p=0,075	p=0,071	p=0,244	p=0,038	p=0,672	p=0,080	p=0,250	p=0,272
pT	1	6,7±0,6	5,3±2,9	15,7±11,5	13,7±14,0	16,7±7,6	46,3±8,3	25,6±4,6	30,3±18,3	47,0±21,8	59,7±17,8	45,7±12,7
	2	13,9±4,7	14,1±6,4	20,4±12,9	13,2±13,9	18,0±13,9	38,9±16,2	23,4±8,7	51,7±26,4	46,8±19,5	61,4±16,2	53,3±16,5
	3	9,9±4,9	10,9±6,6	16,2±10,2	19,6±24,8	18,9±14,4	28,1±20,6	22,2±17,4	34,7±16,9	47,7±21,5	51,3±22,1	44,6±12,9
	4*	12,0±0,0*	9,0±0,0*	10,0±0,0*	14,0±0,0*	0,0±0,0*	40,0±0,0*	18,0±0,0*	23,0±0,0*	31,0±0,0*	44,0±0,0*	32,7±0,0*
		p=0,081	p=0,212	p=0,721				p=0,964				p=0,364
pN	0	12,1±4,9	12,1±6,4	19,8±11,6	16,5±14,2	20,3±12,1	37,7±16,2	34,4±7,4	43,7±24,8	51,9±19,9	61,1±17,7	52,2±16,4
	1	10,0±4,3	8,6±4,4	11,0±3,6	8,7±4,8	6,4±5,3	27,6±12,6	14,2±5,3	37,4±21,6	33,7±16,3	52,1±22,1	41,1±8,1
	2	9,7±6,1	13,0±8,6	19,0±13,6	25,7±36,0	24,3±17,0	34,0±28,6	28,0±24,7	33,3±14,6	49,0±19,3	45,7±18,5	42,7±11,8
		p=0,512	p=0,413	p=0,206				p=0,120				p=0,164
pM	0	11,1±5,1	11,5±6,3	16,9±10,7	15,4±13,6	17,3±13,0	33,6±17,5	22,1±10,2	42,6±23,1	46,6±19,9	60,9±17,1	50,1±14,7
	1	10,7±5,0	11,0±7,8	19,3±13,0	20,7±35,7	19,0±16,5	37,0±23,4	25,6±22,4	30,0±14,2	47,0±21,3	35,8±14,4	37,6±8,2
		p=0,842	p=0,871	p=0,641				p=0,581				p=0,060
UICC	I	12,5±5,6	12,4±7,4	20,5±13,1	14,6±14,2	20,0±12,0	41,3±16,1	25,3±7,6	44,0±26,3	49,0±19,8	61,5±16,8	51,5±17,0
	II	11,0±2,4	11,3±2,9	18,0±7,1	21,5±15,1	21,0±14,3	27,8±13,4	23,4±7,5	42,8±23,6	59,8±20,6	59,8±22,7	54,1±16,9
	III	9,1±5,1	10,3±6,3	10,7±4,5	13,0±12,7	11,0±13,4	25,0±18,2	16,3±13,3	40,3±20,7	35,4±15,8	60,6±17,1	45,4±9,7
	IV	10,7±5,0	11,0±7,8	19,3±13,0	20,7±35,7	19,0±16,5	37,0±23,4	25,6±22,4	30,0±14,2	47,0±21,3	35,8±14,4	37,6±8,2
		p=0,607	p=0,934	p=0,317				p=0,202				p=0,202
G	2	9,9±5,1	10,7±6,1	17,8±10,7	11,5±11,5	15,4±11,8	33,5±18,8	20,1±9,8	42,4±21,6	46,9±18,3	55,5±20,1	48,3±13,5
	3	13,1±3,5	13,1±7,7	15,2±11,4	25,6±27,1	22,9±14,6	33,9±18,1	27,5±16,9	36,4±21,1	44,0±22,3	51,6±19,2	44,0±15,8
		p=0,087	p=0,359	p=0,544				p=0,447				p=0,447

Die angegebenen p-Werte sind über die Expressionswerte der gesamten Gruppe gerechnet.

Z1 = basaler Kryptenabschnitt; Z2 = mittlerer Kryptenabschnitt; Z3 = apikaler Kryptenabschnitt und angrenzendes Oberflächenepithel. * Für das Stadium pT4 liegt nur 1 Fall vor.

Tab. 8: Korrelation der Expression aller Marker mit dem Geschlecht (Sex), der Lokalisation (Lok.) im proximalen oder distalen Kolon, der Tumorausdehnung (pT), Lymphknotenmetastasen (pN), Fernmetastasen (pM), dem Tumorstadium (UICC) und dem Grading (G) bei sporadischem kolorektalen Karzinom.

Sporadisches Karzinom												
Gruppe		p-JNK2 MW (%)	p-JNK123 MW (%)	γ-H2AX MW (%)	p21 ^{WAF1} Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)	Ki67 Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)
Sex	männlich	12,0±2,1	15,6±11,3	33,8±18,0	24,3±11,5	35,7±17,3	42,4±19,0	34,1±10,2	59,2±14,2	53,8±23,6	61,0±21,1	58,0±14,3
	weiblich	10,8±3,4	13,3±10,5	33,3±12,6	14,1±14,3	46,8±16,3	49,6±22,4	36,8±13,4	52,5±19,6	52,8±21,1	44,5±16,0	49,9±11,9
		p=0,324	p=0,647	p=0,947	p=0,094	p=0,168	p=0,450	p=0,617	p=0,389	p=0,924	p=0,077	p=0,204
Lok.	proximal	12,4±3,4	14,6±9,6	34,3±12,5	15,7±14,4	48,0±14,6	32,6±6,9	32,1±8,3	62,6±17,3	59,7±26,7	56,3±20,5	59,5±15,0
	distal	11,0±2,2	14,7±11,7	33,2±17,7	22,7±12,7	35,9±17,7	52,2±21,9	36,9±12,7	53,2±15,7	49,9±19,4	53,4±21,3	52,2±12,7
		p=0,271	p=0,981	p=0,883	p=0,276	p=0,136	p=0,035	p=0,382	p=0,235	p=0,358	p=0,772	p=0,262
pT	2	11,6±2,9	16,6±8,3	29,2±3,3	29,4±16,1	37,2±26,2	50,0±15,2	38,9±16,5	67,2±4,1	53,8±20,7	59,0±27,4	60,0±11,7
	3	11,5±2,4	15,8±11,8	33,7±18,3	17,9±12,1	40,9±12,3	47,3±22,8	35,4±8,2	52,8±16,6	55,8±22,2	54,2±20,5	54,3±15,3
	4	11,3±4,5	7,0±9,5	40,3±19,3	14,3±8,7	41,7±25,1	29,3±10,4	28,4±14,3	53,7±25,1	42,7±29,3	47,7±8,5	48,0±9,0
		p=0,992	p=0,427	p=0,649				p=0,477				p=0,500
pN	0	12,3±3,2	15,7±9,8	32,9±11,3	19,2±11,1	38,3±15,3	42,5±17,1	33,3±9,7	59,1±18,6	51,1±20,0	54,4±20,2	54,9±12,0
	1	11,8±0,8	16,4±15,5	40,0±28,0	28,2±9,9	36,0±15,5	48,2±26,1	37,5±7,0	56,2±11,3	58,6±27,9	65,2±23,5	60,0±15,1
	2	9,6±2,3	10,8±8,1	28,4±3,9	14,4±18,5	47,8±23,7	48,0±23,8	36,7±18,2	51,6±18,1	52,6±24,3	43,6±15,4	49,3±16,2
		p=0,187	p=0,671	p=0,523				p=0,775				p=0,486
pM	0	11,5±2,8	13,2±8,6	30,6±8,6	20,4±13,7	40,6±17,7	43,0±17,9	34,7±11,4	55,7±16,5	55,5±20,5	54,0±21,0	55,1±14,0
	1*	12,0±0,0*	43,0±0,0*	90,0±0,0*	17,0±0,0*	31,0±0,0*	89,0±0,0*	45,7±0,0*	71,0±0,0*	13,0±0,0*	62,0±0,0*	48,7±0,0*
		p=0,855	p<0,001	p<0,001				p<0,001				p=0,660
UICC	I	13,0±2,7	19,0±10,0	30,3±3,8	25,7±17,9	34,0±20,8	44,7±16,6	34,8±14,0	68,7±4,0	43,7±17,5	59,0±18,7	57,1±5,2
	II	12,0±3,5	14,3±10,2	34,0±13,5	16,4±7,0	40,1±13,9	41,6±18,5	32,7±8,7	55,0±21,2	54,3±21,4	52,4±22,0	53,9±14,3
	III	10,6±2,1	10,3±2,2	28,0±3,1	21,8±16,7	43,1±20,7	43,6±19,8	36,2±13,4	52,0±14,0	60,3±21,0	53,6±23,1	55,3±16,6
	IV*	12,0±0,0*	43,0±0,0*	90,0±0,0*	17,0±0,0*	31,0±0,0*	89,0±0,0*	45,7±0,0*	71,0±0,0*	13,0±0,0*	62,0±0,0*	48,7±0,0*
		p=0,548	p=0,150	p<0,001				p=0,772				p=0,962
G	2	11,9±2,9	16,1±11,5	35,3±17,9	20,2±13,6	42,9±16,8	49,5±21,0	37,6±11,2	58,0±15,6	52,0±22,5	50,4±18,1	53,5±10,5
	3	10,2±1,6	10,2±7,3	28,4±3,4	20,4±14,1	31,6±18,0	32,6±11,1	28,2±9,5	52,0±19,8	57,4±22,5	66,4±24,7	58,6±21,8
		p=0,224	p=0,297	p=0,413				p=0,113				p=0,482

Die angegebenen p-Werte sind über die Expressionswerte der gesamten Gruppe gerechnet.

Z1 = basaler Kryptenabschnitt; Z2 = mittlerer Kryptenabschnitt; Z3 = apikaler Kryptenabschnitt und angrenzendes Oberflächenepithel.

Tab. 9: Vergleich der Färbeintensitäten von p-JNK2 und p-JNK123 unter den Gruppen.

Gruppe	p-JNK2	p-JNK123
Kontrolle	2,3±0,5	2,6±0,6
Aktive Colitis	2,7±0,6	2,9±0,3
Remission	2,5±0,6	2,8±0,4
CU Dysplasie	2,4±0,7	2,8±0,6
CU Karzinom	2,0±0,9	2,5±0,8
Divertikulitis	1,5±0,5	1,7±0,9
Adenom	2,1±0,7	2,8±0,5
Karzinom	2,2±0,6	2,4±0,8

Tab. 10: Entwicklung der mittleren Gesamt-p21^{WAF1} und -Ki67-Expression sowie der zonalen Expressionsverteilung. Die angegebenen p-Werte sind gegen die Expressionswerte der Kontrollen gerechnet.

Gruppe	p21 ^{WAF1}				Ki67			
	Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)	Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)
Kontrolle	3.3±4.4	35,0±14,0	82.5±9.5	40.3±6.8	58.1±12.9	32,0±13.4	1.9±3.9	30.6±7.8
aktive Colitis	16.2±13.6 p<0.001	49.2±20.7 p=0.001	79.3±14.4 p=0.237	48.2±12 p<0.001	72.1±13.2 p<0.001	57,0±16.2 p<0.001	20,0±14.6 p<0.001	49.7±9.9 p<0.001
Remission	5.6±5.2 p=0.036	37.2±17 p=0.524	75.4±16.5 p=0.020	39.4±9.9 p=0.647	61.5±13.1 p=0.240	43,0±20.2 p=0.005	8.3±10.3 p<0.001	37.6±11.5 p=0.002
CU-Dysplasie	15.4±13.6 p<0.001	29.6±19.3 p=0.140	56.1±17 p<0.001	33.7±12.7 p=0.004	52.8±19.4 p=0.138	49.4±21,0 p<0.001	32.4±21,0 p<0.001	44.9±13.2 p<0.001
CU-Karzinom	16.2±19 p<0.001	17.9±13.1 p<0.001	33.6±18.2 p<0.001	22.6±12.8 p<0.001	40.4±21.3 p<0.001	45.9±19.4 p=0.001	54.2±19.5 p<0.001	46.8±14.1 p<0.001
Divertikulitis	6.7±6.6 p=0.023	23.6±21.1 p=0.015	49.5±27.5 p<0.001	26.6±14.1 p<0.001	60.3±22.8 p=0.630	28.6±21.5 p=0.454	6.9±10.1 p=0.009	31.9±16 p=0.687
Adenom	14.5±16.3 p<0.001	24.3±18.8 p=0.022	52.8±15.4 p<0.001	30.5±12.9 p=0.001	41.3±19.8 p<0.001	34.9±19.9 p=0.624	48.2±21.7 p<0.001	41.5±12.8 p<0.001
Karzinom	20.3±13.3 p<0.001	40.1±17.4 p=0.224	45.3±20.2 p<0.001	35.2±11.4 p=0.035	56.6±16.4 p=0.686	53.4±22.1 p<0.001	54.4±20.5 p<0.001	54.8±1.7 p<0.001

Z1 = basaler Kryptenabschnitt; Z2 = mittlerer Kryptenabschnitt; Z3 = apikaler Kryptenabschnitt und angrenzendes Oberflächenepithel.

Tab. 11: Korrelation der mittleren Gesamtexpression sowie der zonalen Verteilung von p21^{WAF1} und Ki67 mit dem Geschlecht (Sex), der Lokalisation (Lok.) im proximalen oder distalen Kolon und der Entzündungsaktivität und -chronizität.

Gruppe		n	p21 ^{WAF1}					Ki67				
			Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)	p	Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)	p
Kontrolle												
Sex	männlich	16	2,1±3,0	32,8±13,4	80,1±9,9	38,3±5,8	0,134	56,5±14,7	28,9±12,3	1,6±2,7	29,0±7,4	0,286
	weiblich	24	4,2±5,0	36,5±14,4	84,2±9,0	41,6±7,3		59,0±11,8	34,0±13,9	2,2±4,6	31,8±8,8	
Lokalisation	proximal	15	2,0±2,1	35,4±8,8	79,1±11,4	38,8±4,2	0,309	57,4±10,8	30,6±15,5	0,7±1,2	29,6±7,5	0,490
	distal	25	4,1±5,3	34,8±16,5	84,6±7,6	41,1±8,0		58,5±14,2	32,8±12,1	2,7±4,7	31,3±8,1	
aktive Colitis*												
Sex	männlich	24	15,8±13,6	3,2±21,3	81,1±15,9	50,0±12,1	0,266	72,5±13,5	56,1±15,1	17,9±14,1	48,8±11,1	0,500
	weiblich	18	16,7±14,0	43,9±19,3	76,9±12,1	45,8±11,7		71,7±13,2	58,2±17,9	22,9±15,2	50,9±8,3	
Lokalisation	proximal	6	13,7±12,7	43,5±21,4	79,8±11,6	45,7±8,5	0,577	69,2±17,0	47,8±12,8	20,0±12,1	45,7±7,5	0,285
	distal	36	16,6±13,9	50,1±20,8	79,2±14,9	48,7±12,5		72,6±12,7	58,6±16,3	20,1±15,1	50,4±10,2	
Aktivität	keine/leicht	4	6,3±4,6	35,5±28,4	85,0±2,4	42,3±10,8	0,299	73,3±14,7	54,3±11,9	27,3±24,3	51,6±9,8	0,700
	mäßig/schwer	38	17,2±13,8	50,6±19,7	78,7±15,0	48,9±12,0		72,0±13,3	57,3±16,7	19,3±13,5	49,5±10,1	
Remission**												
Sex	männlich	23	6,5±5,4	38,2±16,0	75,9±18,2	40,2±9,9	0,561	60,1±13,1	42,3±17,2	8,7±9,9	37,1±10,0	0,731
	weiblich	17	4,4±4,8	35,9±18,6	74,7±14,3	38,3±10,1		63,4±13,3	43,8±24,3	7,8±11,1	38,4±13,6	
Lokalisation	proximal	16	6,3±5,5	38,9±17,4	80,6±12,5	41,9±9,2	0,198	68,9±12,6	46,8±19,6	8,8±8,4	41,5±9,9	0,081
	distal	24	5,2±5,0	36,1±17,0	71,9±18,1	37,8±10,2		56,6±11,2	40,4±20,6	8,0±11,5	35,0±12,0	
Zusammenfassung von aktiver Colitis und Remission												
Aktivität	keine/leicht	44	5,7±5,1	37,1±17,9	76,3±16,0	39,7±9,9	<0,001	62,6±13,5	44,0±19,8	10,1±13,0	38,9±12,0	<0,001
	mäßig/schwer	38	17,3±13,9	50,7±20,0	78,8±15,0	48,9±12,0		72,9±13,3	57,4±16,7	19,3±13,6	49,6±10,1	
Chronizität	keine/leicht	40	5,6±5,2	37,2±17,0	75,4±16,5	39,4±9,9	0,001	61,5±13,1	43,0±20,2	8,3±10,3	37,6±11,5	<0,001
	mäßig/schwer	42	16,2±13,6	49,2±20,7	79,3±14,4	48,2±12,0		72,1±13,2	57,0±16,2	20,1±14,6	49,7±9,9	
Divertikulitis***												
Sex	männlich	13	5,6±5,5	20,4±15,6	46,8±28,5	24,3±12,4	0,328	58,1±25,7	30,1±24,0	8,8±11,7	32,3±18,9	0,879
	weiblich	7	8,7±8,5	29,4±29,4	54,6±26,9	30,9±16,9		64,4±17,1	25,9±17,0	3,1±4,9	31,1±9,8	
Aktivität	keine/leicht	10	6,5±6,9	23,0±20,3	57,0±27,8	28,8±15,4	0,490	55,3±22,1	22,4±7,1	5,9±12,3	27,7±17,1	0,254
	mäßig/schwer	10	6,9±6,7	24,1±23,0	42,0±26,5	24,3±13,1		65,3±23,5	19,3±6,1	7,8±8,0	36,1±14,5	
Chronizität	keine/leicht	4	8,0±9,3	23,3±19,3	60,8±23,6	30,7±16,8	0,532	50,8±20,5	24,3±28,4	9,8±17,6	28,3±20,6	0,622
	mäßig/schwer	16	6,4±6,2	23,6±22,1	46,7±28,4	25,6±13,8		62,7±23,3	29,7±20,4	6,1±8,1	32,8±15,4	

Z1 = basaler Kryptenabschnitt; Z2 = mittlerer Kryptenabschnitt; Z3 = apikaler Kryptenabschnitt und angrenzendes Oberflächenepithel; MW = mittlere Gesamtexpression. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die jeweiligen Werte der mittleren Gesamtexpression.

* Keine Differenzierung bezüglich Chronizität möglich, da bei aktiver Colitis nur Fälle mit mäßiger oder schwerer Chronizität vorliegen.

** Keine Differenzierung bezüglich Aktivität und Chronizität möglich, da ausschließlich Fälle ohne oder mit geringer Aktivität bzw. Chronizität vorliegen.

*** Für die Divertikulitis ist keine Differenzierung bezüglich der Lokalisation möglich, da alle Fälle aus dem Sigma (distales Kolon) stammen.

Tab. 12: Korrelation der mittleren Gesamtexpression sowie der zonalen Verteilung von p21^{WAF1} und Ki67 mit dem Geschlecht (Sex), der Lokalisation (Lok.) im proximalen oder distalen Kolon, dem Adenom-Typ (Typ) und dem Grad der intraepithelialen Neoplasie (IEN).

Gruppe		n	p21 ^{WAF1}				p	Ki67				p
			Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)		Z1 (%)	Z2 (%)	Z3 (%)	MW (%)	
CU Dysplasie												
Sex	männlich	41	17,7±14,2	30,8±18,7	55,7±17,3	34,7±12,7	0,279	52,4±20,3	48,6±19,3	34,7±19,5	45,2±12,8	0,718
	weiblich	11	7,1±6,1	25,4±21,5	57,5±16,4	30,0±12,9		54,2±15,9	52,7±27,3	23,8±25,0	43,6±15,3	
Lok.	proximal	11	16,4±13,2	34,5±21,9	58,1±17,0	36,3±13,2	0,453	54,9±17,2	37,5±21,2	25,6±18,7	39,3±13,5	0,118
	distal	41	15,2±13,8	28,3±18,6	55,6±17,1	33,0±12,7		52,2±20,0	52,7±20,0	34,2±21,4	46,4±12,9	
IEN	low-grade	31	18,0±13,8	31,9±16,7	58,1±16,9	36,0±11,6	0,122	54,7±18,6	45,8±20,1	31,9±20,4	44,2±14,0	0,647
	high-grade	21	11,7±12,7	26,3±22,6	53,2±17,0	30,4±13,8		49,9±20,5	54,8±21,6	33,1±22,3	45,9±12,1	
Adenom												
Sex	männlich	10	9,9±13,6	20,7±19,7	50,8±15,7	27,1±15,2	0,257	45,5±13,4	37,1±22,3	45,5±21,1	42,7±10,7	0,687
	weiblich	11	18,6±18,0	27,6±18,2	54,6±15,7	33,6±10,0		37,4±24,2	32,8±18,4	50,7±22,9	40,4±14,8	
Lok.	proximal	7	24,4±19,0	33,6±17,9	55,3±14,3	37,8±9,1	0,067	47,4±28,2	36,4±19,5	55,3±23,3	46,4±17,4	0,222
	distal	14	9,5±12,8	19,7±18,1	51,6±16,3	26,9±13,2		38,3±14,3	34,1±20,9	44,7±20,8	39,0±9,6	
Typ	tubulär	9	18,1±18,1	29,0±21,4	48,7±18,6	31,9±15,5	0,680	39,4±23,3	37,6±20,1	44,9±22,8	40,6±14,1	0,800
	tubulo-vill.	12	11,8±15,1	20,8±16,8	55,9±12,5	29,5±11,1		42,8±17,6	32,8±20,5	50,8±21,4	42,1±12,3	
IEN	low-grade	10	11,4±16,6	21,8±15,9	54,8±12,8	29,3±10,8	0,693	41,0±21,0	39,1±22,1	49,8±14,7	43,3±11,9	0,547
	high-grade	11	17,3±16,3	26,6±21,6	52,0±17,9	31,6±14,9		41,6±19,6	31,0±18,0	46,8±27,2	39,8±13,9	

Z1 = basaler Kryptenabschnitt; Z2 = mittlerer Kryptenabschnitt; Z3 = apikaler Kryptenabschnitt und angrenzendes Oberflächenepithel; MW = mittlere Gesamtexpression.
Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die jeweiligen Werte der mittleren Gesamtexpression.

Tab. 13: Analyse des Alterseinflusses auf die Unterschiede zwischen den Kollektiven mit 2-faktorieller Varianzanalyse mit Wechselwirkung und Alter als Covariable. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den statistischen Effekt des Alters auf die Unterschiede der Proteinexpression zwischen den Kollektiven.

Protein	p-JNK2	p-JNK123	γ-H2AX	p21 ^{WAF1}	Ki67	
Alter × Kollektiv	p	0,49	0,88	0,25	0,08	0,71

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Veränderungen des JNK-Signalweges in der entzündungsassoziierten Karzinogenese der CU *in vivo*. Dazu wurden immunhistologische Untersuchungen zu p-JNK2, p-JNK123, γ -H2AX, p21^{WAF1} und Ki67 an Kolon-Biopsien und -Resektaten von Patienten mit aktiver CU, CU in Remission, CU-assoziierten Dysplasien und CU-assoziierten Karzinomen durchgeführt. Zum Vergleich wurden Biopsien und Resektate von tumor- und entzündungsfreier Kolonschleimhaut, Sigmadivertikulitiden, sporadischen Adenomen und sporadischen kolorektalen Karzinomen betrachtet.

Aktivierung des JNK-Signalwegs bei Colitis ulcerosa

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise darauf, dass der JNK-Signalweg eine wesentliche Rolle bei Entzündungsprozessen im Allgemeinen und bei der CU im Speziellen spielt^{288 187 96 287 133 93 264 2}. So wird der JNK-Signalweg durch ROS und zahlreiche Zytokine, vor allem durch TNF α und IL-1, aktiviert^{114 53 192}. Außerdem ist JNK an der Regulation der T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung sowie wiederum an der Synthese verschiedener Zytokine wie IL-2, IL-6 und TNF α und Metalloproteasen beteiligt^{93 53 172}. Passend dazu konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine signifikante Expressionszunahme sowohl von p-JNK2 als auch von p-JNK123 bei der **aktiven Colitis** im Vergleich zu den Kontrollen verzeichnet werden. Außerdem stiegen die p-JNK2- und p-JNK123-Expression mit zunehmender Entzündungsintensität (Tab. 4; Abb. 9-12 und 15). Diese Ergebnisse decken sich mit den *in vitro* Beobachtungen am eingangs erwähnten zellulären Colitis-Modell^{214 215} und liefern einen weiteren Beleg für die Bedeutung des JNK-Signalwegs bei CU. Auch andere immunhistologische Arbeiten wiesen eine erhöhte p-JNK-Expression sowohl im Kolonepithel als auch in Makrophagen und Lymphozyten bei aktiver CU nach^{187 288 96 287}. In Maus- und Rattenmodellen konnte eine direkte Verbindung zwischen einer JNK-Aktivierung und der Schädigung der Kolon- und Magenschleimhaut bei DSS (dextran sulphate sodium)-induzierter Colitis und Ethanol-bedingter Gastritis hergestellt werden^{4 188}. Nach Behandlung der Tiere mit dem JNK-Inhibitor SP600125 fand sich eine deutliche klinische und histologische Verbesserung. Assi et al. sahen außerdem eine verringerte TNF α -Expression, eine Reduktion des Entzündungsinfiltrates sowie eine stark herabgesetzte Apoptoserate in der Kolonschleimhaut⁴. Tran et al. konnten an Magenschleimhautepithelien zeigen, dass die durch eine *Helicobacter pylori*-Infektion verursachte Zytokin-Expression unter anderem durch Inhibition des JNK-Signalwegs verringert werden konnte²⁷⁶.

Trotz der umfangreichen Studienlage wurde bisher kaum untersucht, ob die verschiedenen

JNK-Isoformen bei der CU unterschiedlich agieren^{13 290}. Zur Klärung dieser Frage führten Chromik et al. Untersuchungen an JNK1- und JNK2-knock-out-Mäusen durch⁴⁵. Dabei stellten sie fest, dass der Knock-out weder der einen noch der anderen Isoform allein die Entstehung einer Colitis verhinderte. Die JNK2-knock-out-Mäuse zeigten im Vergleich zum Wild-Typ sogar einen schlechteren Verlauf. Als mögliche Erklärung nannten Chromik und Kollegen die pro-apoptotische Wirkung von JNK2 in Lymphozyten, die durch den Knock-out fehlte, wodurch die Entzündung prolongiert wurde. Kersting und Kollegen kamen bei Untersuchungen an JNK2-knock-out-Mäusen zu vergleichbaren Ergebnissen¹³¹. Diese entwickelten im Gegensatz zu Wildtyp- und JNK1-knock-out-Mäusen eine Colitis durch Gabe niedriger Dosen DSS. Das würde für eine protektive Rolle von JNK2 sprechen, was die Arbeitsgruppe um Mandič et al. weiter untermauern konnte¹⁷¹. Huang et al. konnten außerdem in einem Mausmodell mit DSS-induzierter Colitis zeigen, dass die spezifische Suppression von p-JNK1 zu einer Normalisierung der zuvor durch TNF α supprimierten, endogenen Steroidproduktion im Kolonepithel mit konsekutiv reduzierter Entzündung führte⁹⁸. Es scheinen also sowohl JNK1 als auch JNK2 bei der aktiven Colitis aktiviert zu werden, was die hier vorgestellten Ergebnisse mit einer bei aktiver Colitis erhöhten pJNK2- und pJNK123-Expression bestätigen konnten. Allerdings scheinen die JNK-Isoformen sich in ihrer Funktion und Wirkung zu unterscheiden.

In Zukunft könnte die **Hemmung des JNK-Signalwegs** eine neue therapeutische Option bei der CU, vor allem bei Steroid-resistenten Fällen darstellen^{4 187 8}. Es gibt zwei Hauptklassen von JNK-Inhibitoren - die ATP-kompetitiven und die peptinergen Inhibitoren¹⁹. Beispiele der ersten Klasse sind Inhibitoren wie SP600125 und CEP-1347 (KT7515), die umfangreich in verschiedensten entzündlichen Zusammenhängen auch außerhalb des Gastrointestinaltrakts untersucht worden sind^{152 270 295 146 29 316}. Diese Inhibitor-Klasse ist weder spezifisch für die einzelnen JNK-Isoformen noch für die JNK-Kinase-Familie. So kann SP600125 neben JNK noch mindestens 13 andere Kinasen hemmen²⁶⁹. Deshalb wurde eine **zweite Generation ATP-kompetitiver Inhibitoren** wie CC-401 entwickelt. CC-401 ist ein potenter Inhibitor aller drei JNK-Isoformen. Eine Phase 1 Studie mit CC-401 für akute myeloische Leukämie konnte allerdings aufgrund von Nebenwirkungen nicht fortgesetzt werden und die Entwicklung von CC-401 wurde beendet¹⁸⁴. Ein weiteres Beispiel ist CC-930. Van der Velden et al. konnten in einer Phase 1- und einer Phase 2-Studie nachweisen, dass die Behandlung mit CC-930 einen positiven Effekt auf die Entwicklung idiopathischer interstitieller Lungenerkrankungen hatte²⁷⁹. Allerdings zeigten sich zahlreiche teils Therapie-limitierende Nebenwirkungen. Semapimod (CNI-1493), ein Guanylhydrazon, hat eine völlig andere Struktur und scheint posttranskriptional zu wirken und die Produktion proinflammatorischer Zytokine, die durch JNK und p38 reguliert werden, zu beeinflussen⁴⁸. *In vitro*-Kinase-Assays konnten zeigen, dass sein direktes molekulares Ziel die c-Raf-Proteinkinase ist, die ein upstream Modulator

des MAPK-Signalweges ist ¹⁸⁴. Löwenberg et al. beobachteten eine Korrelation zwischen dem klinischen Ansprechen von Morbus Crohn Patienten auf die Semapimod-Behandlung und einem signifikanten Absinken der JNK-Phosphorylierung ¹⁶¹. In den Untersuchungen von Hommes et al. an 12 Patienten mit Morbus Crohn, die über 12 Tage mit Semapimod behandelt wurden, kam es zu einer deutlichen Beschwerdebesserung ⁹⁶. Dotan et al. konnten dies in ihrer deutlich umfangreicheren Arbeit mit Morbus Crohn Patienten allerdings nicht bestätigen. Semapimod zeigte sich hier nahezu wirkungslos, zudem trat eine Phlebitis als schwere Dosis-limitierende Nebenwirkung auf ⁶¹. Im Gegensatz zu den bisher genannten JNK-Inhibitoren die nicht Isoform-spezifisch wirken, wurde der **peptinerge JNK-Inhibitor** D-JNKI-1 (XG-102, AM-111) entwickelt, um spezifisch JNK1 zu inhibieren ^{184 22}. Er hemmt nicht die enzymatische Aktivität von JNK sondern blockiert kompetitiv den Zugang zahlreicher JNK-Substrate. Dieser selektive JNK-Inhibitor eröffnet viele interessante therapeutische Möglichkeiten ^{243 293}. Die Arbeitsgruppe um Reinecke et al. nutzte D-JNKI-1 bei Mäusen mit einer TNBS- (2,4,6-Trinitrobenzol-sulfonsäure) induzierten Colitis und wies nach, dass die Behandlung eine hochgradige Verbesserung der Klinik, der Histologie mit Abnahme an Ulzerationen und Normalisierung der Architektur sowie eine Reduktion des Entzündungsinfiltrates und des TNF α -Spiegels bewirkte ²²¹. Außerdem nahm das Level an Apoptose-assoziierten Proteinen und p53 sowie die Caspase 3-Spaltung ab. Kersting et al. kamen zu einem nahezu identischen Ergebnis als sie die Wirkung von D-JNKI-1 an Mäusen mit DSS-induzierter Colitis untersuchten ¹³⁰. Für langfristige Therapieansätze am Menschen werden noch detailliertere Erkenntnisse über die Isoform-spezifischen Wirkungen von JNK und insbesondere weitere Isoform-spezifische, nebenwirkungsärmere Inhibitoren benötigt ⁷⁷.

p-JNK2 könnte als Tumorsuppressor in der Colitis-assoziierten und sporadischen Karzinogenese wirken

In der hier vorliegenden Arbeit konnte, beginnend bei der **Colitis in Remission**, im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikanter Abfall der p-JNK2-Expression beobachtet werden. Die Expression zeigte bei den **Colitis-assoziierten Dysplasien** eine weitere Reduktion und erreichte den niedrigsten Wert beim **Colitis-assoziierten Karzinom** (Tab. 4; Abb. 9 und 10). Mit steigendem Tumorstadium war eine leichte Abnahme der p-JNK2-Expression zu verzeichnen. Dem gegenüber stieg die Expression mit sinkendem Differenzierungsgrad nahezu signifikant (Tab. 7). Die hier vorliegenden immunhistologischen Ergebnisse decken sich mit den *in vitro* Ergebnissen des zellulären Colitis-Modells, bei dem eine Abnahme der p-p54-JNK-Expression bei beginnender maligner Transformation der Zellen zu beobachtet war ²¹⁵. Das **sporadische Adenom** zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion der p-JNK2-Expression, die jedoch weniger stark ausgeprägt war als die der Colitis-assoziierten Dysplasien (Tab. 4). Das p-JNK2-Level beim **sporadischen kolorektalen Karzinom** war

identisch zu dem der Colitis-assoziierten Karzinome (Tab. 4; Abb. 9 und 10). Auch bei den sporadischen kolorektalen Karzinomen zeichnete sich eine leichte Expressionsabnahme mit zunehmendem Tumorstadium ab (Tab. 8). Mit sinkendem Differenzierungsgrad war hier eine geringe Abnahme der p-JNK2-Expression zu beobachten (Tab. 8). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass **p-JNK2 als Tumorsuppressor im Kolon** insbesondere im Rahmen der CU-assoziierten Entzündung fungieren könnte. Dafür spricht auch die Arbeit von Vasilevskaya et al., die an verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien zeigen konnte, dass die Etablierung einer dominant-negativen, isolierten Mutation des JNK1-Gens, zu einer Überwindung der zuvor, durch eine Hypoxie-bedingte JNK-Aktivierung ausgelösten Chemoresistenz führte, was durch eine dominant-negative Mutation des JNK2-Gens nicht gelang²⁸¹. Zu einem gleichartigen Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe um Zhu³¹⁸. Untersuchungen an JNK2-defizienten Hepatozyten und Fibroblasten, die im Vergleich zum korrespondierenden Wild-Typ eine gesteigerte Proliferation aufwiesen, legten ebenfalls eine potentiell tumorprotektive Funktion für JNK2 nahe²³². Als Erklärung konnten Studien zeigen, dass bei Fehlen von JNK2 der Abbau des proliferationsfördernden Transkriptionsfaktors c-Jun reduziert ist, wodurch der c-Jun-Spiegel steigt, was eine vermehrte Proliferation zur Folge hat.^{233 232}. Weitere Arbeiten ergaben, dass JNK2 für die Phosphorylierung von p53 an Serin 6 verantwortlich ist, was maßgeblich für dessen Stabilisierung und Aktivierung ist^{74 206}. Im Gegensatz dazu konnten Ke et al. zeigen, dass JNK2 in dermalen Plattenepithelkarzinomen unter anderem durch das Zusammenspiel mit verschiedenen Onkogenen wie Ras eine tumorfördernde Wirkung hat¹²⁷. So wiesen auch Chen et al. bei JNK2-knockout Mäusen eine deutlich erhöhte Rate und ein verstärktes Wachstum von TPA-(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) induzierten Papillomen im Vergleich zu korrespondierenden Wild-Typ-Mäusen nach^{41 306}. Diese Arbeiten bestätigen, dass die Wirkung von JNK stark Gewebe-abhängig ist. Wir konnten mit der hier vorliegenden Arbeit weitere Anhaltspunkte dafür liefern, dass JNK2 sowohl in der CU-assoziierten als auch der sporadischen Karzinogenese eine tumorprotektive Funktion erfüllen könnte.

Hinweise auf eine onkogene Funktion von p-JNK1 in der Colitis-assoziierten und der sporadischen Karzinogenese

Die p-JNK123-Expression war in der **aktiven Colitis** deutlich erhöht (Tab. 4; Abb. 11, 12 und 15). Im Gegensatz zur p-JNK2-Expression, die bei **Remission** unter den Wert der Kontrollen sank, nahm p-JNK123 bei Remission nur leicht ab und lag weit über dem Expressionswert der Kontrollen (Tab. 4; Abb. 11, 12 und 15). Bei den **Colitis-assoziierten Dysplasien** sank die p-JNK123-Expression, anders als p-JNK2, weiterhin nicht unter das Niveau der Kontrollen (Tab. 4). Erst bei den **Colitis-assoziierten Karzinomen** nahm die p-JNK123-Expression deutlich ab und erreichte den Wert der p-JNK2-Expression (Tab. 4; Abb. 11 und

12). Die p-JNK123-Expression war bei den **sporadischen Adenomen** gegenüber den Kontrollen weitgehend unverändert, womit sie sich nicht wesentlich von der p-JNK123-Expression der Colitis-assoziierten Dysplasien unterschied. Die p-JNK123-Expression der **sporadischen kolorektalen Karzinome** lag nahezu auf dem Niveau der Colitis-assoziierten Karzinome (Tab.4; Abb. 11 und 12). Sowohl bei den Colitis-assoziierten als auch bei den sporadischen kolorektalen Karzinomen war mit steigendem Tumorstadium eine geringe Abnahme der p-JNK123-Expression erkennbar, was an das Expressionsverhalten von p-JNK2 erinnerte (Tab. 7 und 8). Ebenso wie p-JNK2, zeigte p-JNK123 bei den Colitis-assoziierten Karzinomen eine leichte Expressionszunahme mit steigender Entdifferenzierung, wohingegen sich die Expression bei den sporadischen kolorektalen Karzinomen tendenziell gegenteilig verhielt (Tab. 7 und 8).

Da p-JNK3 nicht im Kolon exprimiert wird und p-JNK2 wie oben beschrieben in Remission, Colitis-assoziiierter Dysplasie und sporadischem Adenom vermindert war, spekulieren wir, dass die beobachtete Erhöhung der p-JNK123-Expression bei Remission und den intraepithelialen Neoplasien durch **p-JNK1** verursacht wurde. Diese Beobachtung gleicht dem Ergebnis des zellulären Colitis-Modells, bei dem ebenfalls eine Erhöhung von p-p46-JNK in der entzündungsfreien, chronischen Phase verzeichnet wurde ²¹⁵. Da die p-JNK123-Expression sowohl beim Colitis-assoziierten als auch beim sporadischen kolorektalen Karzinom auf das gleiche Level abfiel wie p-JNK2, ist zu vermuten, dass die p-JNK123-Reduktion auch hier durch p-JNK1 bedingt war, jedoch nicht spezifisch für die Colitis-assoziierte Karzinogenese ist. Eine genaue Abgrenzung der p-JNK1- und p-JNK2-Expression voneinander war durch den p-JNK123-Antikörper jedoch nicht möglich.

Es stellt sich die Frage, ob die postulierte p-JNK1-Erhöhung in der frühen Phase der Colitis-assoziierten und sporadischen Karzinogenese auf eine **onkogene Wirkung von p-JNK1** hinweist. Darauf deuten verschiedene Arbeiten hin, die eine JNK1-Aktivierung in intestinalen Karzinomen und intestinalen Tumor-Zelllinien nachweisen konnten ^{199 170 309}. Yao et al. bewirkten in einem Mausmodell mit Xenografts der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 eine drastische Reduktion des Tumorwachstums durch Applikation des spezifischen JNK1-Inhibitors Licochalcone A ³⁰⁹. Auch Tiermodelle von Magenkarzinomen zeigten, dass JNK1 und nicht JNK2 zur Tumorentwicklung nach Gabe des chemischen Karzinogens N-methyl-N-Nitrosourea beitrug ²⁵². Wie oben beschrieben fanden verschiedene Arbeitsgruppen zudem Anhaltspunkte dafür, dass JNK1 in unterschiedlichen Kolonkarzinom-Zelllinien wesentlich daran beteiligt ist, dass diese eine Resistenz gegen Chemotherapeutika entwickelten ^{281 318}. Auch Untersuchungen an anderen Gewebearten fanden Hinweise auf eine onkogene Funktion von JNK1. So konnten Sabapathy und Kollegen in JNK1-defizienten Fibroblasten und Hepatozyten eine verlangsamte Proliferation gegenüber dem jeweiligen Wild-Typ beobachten, was sie durch die speziell von JNK1 ausgeübte Phosphorylierung und somit

Aktivierung und Stabilisierung von c-Jun erklärten^{233 232}. Weitere Studien wiesen nach, dass JNK1 in der hepatozellulären Karzinogenese die c-myc- und CyclinD1-Expression erhöhte und so die p21^{WAF1}-Expression reduzierte, was ebenfalls proliferationsfördernd wirkte^{99 56}. Dies bestätigten auch andere Arbeiten an hepatozellulären Karzinomen, die eine isolierte Zunahme der JNK1-Expression in über 50% der Fälle beobachteten^{99 35}. Außerdem war die erhöhte JNK1-Expression mit einer schlechteren Prognose und der gesteigerten Expression von Stammzellmarkern wie AFP (α -Fetoprotein) assoziiert³⁶. In Mausmodellen reduzierte die genetische Disruption des *JNK1*-Lokus die Anzahl und Größe hepatozellulärer Karzinome, die durch Gabe von Diethylnitrosaminen hervorgerufen worden waren⁹⁹. Beim Tabakrauch-assoziierten Lungenkarzinom konnte gezeigt werden, dass JNK1 wesentlich an der Unterhaltung der Tabakrauch-bedingten Entzündung beteiligt war und so die Tumorentstehung unterstützte²⁶⁷. In Zellkulturen die aus kindlichen Sarkomen hervorgegangen waren, führte ausschließlich die Suppression von JNK1 durch siRNA (small interfering RNA) zu einer Wachstumsreduktion⁶².

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen fanden Tong und Kollegen im Gastrointestinaltrakt von JNK1-knock-out Mäusen eine tumor-supprimierende Wirkung für JNK1²⁷³. Bereits die tumorfreie Schleimhaut der Mäuse zeigte eine deutlich erhöhte Proliferationsrate bei gleichzeitig beeinträchtigter Differenzierung. Die Arbeitsgruppe wies parallel eine starke p21^{WAF1}-Reduktion nach, was eine Erklärung für diese Veränderungen sein könnte. Zu korrespondierenden Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe um Song et al., die sowohl in Zellkultur-Experimenten als auch in einem Mausmodell nachwies, dass JNK1 auch für die tumorprotektive Wirkung des NSARs Sulindac essentiell ist²⁵⁸. Auch hier wurde der Effekt durch eine JNK1-abhängige Aktivierung von p21^{WAF1} vermittelt. In beiden Studien wurde allerdings nicht überprüft, ob diese Prozesse auch von JNK2 hätten vermittelt werden können. Weitere Arbeitsgruppen konnten in Mausmodellen zu TPA- (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) induzierten Hauttumoren eine tumorsupprimierende Funktion für JNK1 dokumentieren^{250 41}.

Zusammenfassend kann man sagen, dass JNK1 und JNK2 je nach Gewebeart und Konstellation sowohl **pro-** als auch **anti-onkogene Wirkungen** entfalten können. Außerdem scheint die Intensität des JNK-aktivierenden Signals von entscheidender Bedeutung zu sein. Bei vorübergehender JNK-Aktivierung, wie sie von vielen Zytokinen wie TNF α ausgelöst wird, scheint JNK Signalkaskaden zu aktivieren, die das **Zell-Überleben** fördern können²²². Eine dauerhafte JNK-Aktivierung leitet vermutlich die Apoptose ein²⁸². Des Weiteren nimmt man an, dass es vom **Tumorstadium** abhängt wie JNK wirkt⁹⁵, was wir in unseren Untersuchungen allerdings nicht darstellen konnten.

Die hier vorliegende Arbeit erbrachte Hinweise darauf, dass im Kontext der Colitis-

assoziierten kolorektalen Karzinogenese JNK2 eine tumorsupprimierende und JNK1 eine eher tumorfördernde Funktion hat. Um diese Vermutungen zu validieren sind jedoch weiterführende Untersuchungen beispielsweise mit größeren Kohorten, die insbesondere intraepitheliale neoplastische Läsionen und Frühkarzinome aufweisen erforderlich.

Verminderter γ -H2AX-Anstieg in der Colitis-assoziierten Karzinogenese

γ -H2AX ist ein DNA-Schadensmarker, der bevorzugt bei DNA-Doppelstrangbrüchen auftritt^{226 245 212}. Diese können primär oder sekundär aufgrund von akkumulierten DNA-Schäden entstehen²¹⁴. Da bei Entzündungen vermehrt ROS gebildet werden, entstehen hier mehr DNA-Schäden, und der γ -H2AX-Spiegel steigt an^{197 225}. Passend dazu zeigte sich auch in der hier vorliegenden Arbeit eine signifikante Erhöhung von γ -H2AX in der **aktiven Colitis** und ein Absinken der γ -H2AX-Expression auf das Niveau der Kontrollen bei **Remission** (Tab. 4; Abb. 13 und 14). Es war zudem ein signifikanter Anstieg von γ -H2AX mit zunehmendem Grad der Entzündungsaktivität und -chronizität nachweisbar (Tab. 5). Im Zellkulturmodell konnte ebenfalls eine γ -H2AX-Erhöhung *in vitro*, direkt nach Behandlung von HCEC mit H₂O₂ beobachten werden²¹⁴. Risques et al. sahen im Einklang mit unseren Ergebnissen ebenfalls eine γ -H2AX-Vermehrung im Kolonepithel von Patienten mit CU²²⁵. Die Arbeitsgruppe um Westbrook führte Untersuchungen an T-Lymphozyten und Kolonepithelien verschiedener Colitis-Mausmodelle durch und konnte auch eine γ -H2AX-Erhöhung beobachten²⁹⁷. Passend dazu fanden Shen et al. deutlich gesteigerte γ -H2AX-Werte in den Kolonepithelien Helicobacter sanguini-infizierter Mäuse und Primaten, welche eine erhöhte Colitis- und Kolonkarzinom-Neigung zeigten²⁵¹. Auch Arbeiten an anderen Gewebearten fanden Belege für eine Entzündungs-assoziierte γ -H2AX-Erhöhung^{154 107 197 34}.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit war ein signifikanter Anstieg von γ -H2AX in der **Colitis-assoziierten Karzinogenese** im Vergleich zu den Kontrollen und auch der Colitis-assoziierten Entzündung zu beobachten. Dabei steigerte sich der γ -H2AX-Spiegel von der Colitis-assoziierten Dysplasie zum Colitis-assoziierten Karzinom signifikant (Tab. 4, Abb. 13 und 14). Für die Colitis-assoziierten Dysplasien zeichnete sich eine Steigerung der γ -H2AX-Spiegel mit zunehmendem Dysplasie-Grad ab (Tab. 6). Bei den Colitis-assoziierten Karzinomen konnte kein Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und dem γ -H2AX-Spiegel ermittelt werden (Tab. 7). Lediglich bei Nachweis von Fernmetastasen war ein tendenzieller γ -H2AX-Anstieg zu verzeichnen. Mit zunehmender Entdifferenzierung kam es hier zu einer leichten γ -H2AX-Reduktion. Die **sporadischen Adenome** zeigten eine γ -H2AX-Expression, die der der Colitis-assoziierten Dysplasien glich (Tab. 6). Das **sporadische kolorektale Karzinom** wies interessanterweise einen weit über dem der Colitis-assoziierten Karzinome liegenden γ -H2AX-Spiegel auf, der mit zunehmendem Tumorstadium und

Nachweis von Fernmetastasen eine leichte Abnahme zeigte (Tab. 4 und 8; Abb. 13 und 14). Eine Abnahme des Differenzierungsgrades war mit einer geringfügigen γ -H2AX-Erhöhung assoziiert (Tab. 8).

Die Arbeitsgruppe um Oka et al. sah bei der Untersuchung von sporadischen Adenomen und Karzinomen mittels Immunhistologie und Western Blot ebenfalls einen signifikanten γ -H2AX-Anstieg, wobei dieser mit einem steigenden Tumorstadium korrelierte ²⁰⁵. Dies konnten Lee et al. bestätigen, die ebenfalls eine erhöhte γ -H2AX-Expression bei sporadischen kolorektalen Karzinomen nachwiesen und auch eine Korrelation des γ -H2AX-Spiegels mit dem Tumorstadium und der Prognose fanden ¹⁵⁰. Matsuda et al. betrachteten die Expression von γ -H2AX in Fällen mit chronischer Hepatitis, Leberzirrhose, dysplastischen Knoten und hepatozellulären Karzinomen, wobei sie vergleichbar zu unseren Ergebnissen eine kontinuierliche γ -H2AX-Zunahme von der chronischen Hepatitis zum hepatozellulären Karzinom sahen ¹⁷⁸. Die Arbeitsgruppe um Matthaios et al. führte immunhistologische Untersuchungen an nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen durch und fand hier eine deutliche γ -H2AX-Erhöhung ¹⁷⁹. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der γ -H2AX-Erhöhung und der Prognose hergestellt werden, wobei ein niedriger γ -H2AX-Spiegel mit einem längeren Überleben assoziiert war. γ -H2AX wurde in diesem Zusammenhang als prädiktiver Marker vorgeschlagen ²⁴⁴. Aufgrund der uns nicht vorliegenden klinischen Daten konnten wir eine gleichartige Verbindung an unseren Kollektiven leider nicht untersuchen.

Insgesamt sprechen sowohl unsere Ergebnisse als auch die Ergebnisse der Literaturrecherche für eine Aktivierung der DNA-Schadens-Antwort in Form erhöhter γ -H2AX-Spiegel sowohl bei akuter Entzündung als auch im Rahmen der Colitis-assoziierten und der sporadischen Karzinogenese. Die γ -H2AX-Erhöhung scheint hier Ausdruck eines gesteigerten DNA-Schadens mit konsekutiv aktivierter DDR zu sein. Allerdings war die γ -H2AX-Erhöhung bei den Colitis-assoziierten Neoplasien signifikant schwächer ausgeprägt als bei den sporadischen kolorektalen Neoplasien. Dieser Unterschied könnte Ausdruck eines pathologisch herabgesetzten γ -H2AX-Spiegels bei CU und einer folglich verminderten Aktivierung der DNA-Schadens-Antwort, im Sinne eines maskierten DNA-Schadens sein, wie er bereits in dem zellulären Colitis-Modell beschrieben wurde ²¹⁴. Das wäre auch ein denkbare Szenario im Rahmen der malignen Transformation. Dafür, dass eine fehlende Aktivierung von H2AX zu einer malignen Transformation beiträgt, sprechen Studien, die Mutationen des H2AX-Gens oder assoziierter DNA-Schadens-Antwort-Proteine wie ATM und ATR mit folglich herabgesetzter H2AX-Phosphorylierung nachgewiesen haben ^{209 262 163}.

Überwindung von DNA-Schadens-Kontrollpunkten bei Colitis-assoziiierter und sporadischer kolorektaler Karzinogenese

p21^{WAF1} ist ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, dessen Überexpression in einem G1-, G2- und S-Phase-Arrest resultiert^{75 76 216 204 200}. p21^{WAF1} ist wesentlich an der Differenzierung von Zellen beteiligt, indem der von ihm ausgelöste Zellzyklus-Arrest den Übergang in die G0-Phase ermöglicht^{160 296 168}. Als Ausgangspunkt unserer Untersuchungen zu p21^{WAF1} betrachteten wir die Expression innerhalb der Kolonkrypten gesunder **Kontrollen** (Abb. 16). Das Kryptenepithel des Kolons zeigte, wie bereits 1963 von Lipkin beschrieben, eine von den an der Kryptenbasis gelegenen Stammzellen ausgehende Regeneration mit stufenweise fortschreitender Differenzierung der zur Schleimhautoberfläche wandernden Zellen mit parallel abnehmender proliferativer Aktivität^{157 59 158}. Dementsprechend konnten wir ein zonales Verteilungsmuster mit hoher p21^{WAF1}-Expression im apikalen Anteil der Krypte und im Oberflächenepithel beobachten (Tab. 10; Abb. 16-21). Dieses Expressionsmuster deckt sich mit anderen immunhistologischen Arbeiten zu p21^{WAF1} in der Kolonschleimhaut^{311 296 59 280}. Bei der **aktiven Colitis** sahen wir in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten einen signifikanten Anstieg der Gesamt-p21^{WAF1}-Expression, was vor allem durch einen Expressionsanstieg im mittleren und basalen Kryptendrittel bedingt war, wo sich unter Normalbedingungen nahezu ausschließlich proliferierende, p21^{WAF1}-negative Zellen finden (Tab. 10; Abb. 16-21)^{3 301}. Der Anstieg von p21^{WAF1} spricht für eine vermehrte Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten, am ehesten aufgrund entzündungsassoziiierter ROS und konsekutiver DNA-Schäden^{216 3}. Dafür spricht auch der in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebene Anstieg von γ -H2AX in der aktiven Colitis. Allerdings war für γ -H2AX kein zonales Verteilungsmuster innerhalb der Krypte zu verzeichnen. Die Zunahme der γ -H2AX-Expression und der Gesamt-p21^{WAF1}-Expression verliefen jedoch parallel. Das Ausmaß der Veränderungen der p21^{WAF1}-Expression war abhängig vom Grad der Entzündungsaktivität und -chronizität (Tab. 11). Auch die Arbeitsgruppe um Arai et al. konnte einen Anstieg der p21^{WAF1}-Expression bei aktiver CU sowie eine Korrelation der Expression mit dem Grad der Entzündung nachweisen³. Ioachim et al. sahen auch eine gesteigerte p21^{WAF1}-Expression bei aktiver CED, wobei sie nicht zwischen CU und MC differenzierten¹⁰⁴. Bei anderen chronischen Entzündungen wie der chronischen Hepatitis-B wurde ebenfalls eine vermehrte p21^{WAF1}-Expression beobachtet^{266 64}. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fällen mit Colitis in **Remission** konnte, wie auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, eine weitgehende Normalisierung der p21^{WAF1}-Expression beobachtet werden^{3 301} (Tab. 10; Abb. 16-21). Allerdings zeigte sich der p21^{WAF1}-Spiegel in unseren Untersuchungen im apikalen Kryptendrittel gegenüber den Kontrollen reduziert. Das lässt sich am ehesten durch eine kompensatorisch verstärkte regenerative Proliferation bei erhöhtem Zellumsatz nach vorhergehendem rezidivierten Epithelschaden erklären³.

Andere Studien kamen grundsätzlich zu einem gleichartigen Ergebnis, konnten jedoch einen Anstieg der p21^{WAF1}-Expression mit zunehmender Erkrankungsdauer der CU nachweisen^{3, 186}. Diesen Zusammenhang konnten wir leider nicht untersuchen, da uns keine exakten klinischen Daten zur Erkrankungsdauer vorlagen. Es ließ sich also nicht überprüfen, ob die von uns beobachtete Reduktion von p21^{WAF1} bei langjährigen Verläufen zu- oder abnimmt. Eine Expressions-Zunahme würde für eine intakte DNA-Schadensantwort sprechen, wohingegen eine Abnahme der Expression auf eine beginnende Fehlregulation mit unkontrollierter Akkumulation von DNA-Schäden hinweisen würde.

Mit dem Auftreten **Colitis-assoziiertes Dysplasien** ging bei unseren Untersuchungen eine starke Abnahme der Gesamt-p21^{WAF1}-Expression mit beginnender Aufhebung der zonalen Verteilung einher (Tab. 10; Abb. 16-21). Diese Beobachtung bestätigten auch andere Arbeitsgruppen^{280 301}. Ebenso wie bei den Untersuchungen von Wong et al. sank die p21^{WAF1}-Expression bei den von uns untersuchten **Colitis-assoziierten Karzinomen** noch einmal signifikant³⁰¹ (Tab. 10; Abb. 16-21). Wir konnten eine geringe, tendenzielle Reduktion der p21^{WAF1}-Expression mit zunehmendem Tumorstadium nachweisen (Tab. 7). Der statistische Zusammenhang war bei geringer Stichprobengröße jedoch schwach. Auch Wong et al. sahen einen, bei den Dysplasien beginnenden und zu den Karzinomen fortschreitenden Abfall der Expression³⁰¹. Die Arbeitsgruppe um Mitsuhashi kam bei der immunhistologischen Untersuchung von 49 Rektumresektaten von CU-Patienten zu einem partiell gegenteiligen Ergebnis¹⁸⁶. Sie sahen eine Zunahme der p21^{WAF1}-Expression bei Dysplasien und Karzinomen verglichen mit aktiver CU und Colitis in Remission, was sie auf eine Akkumulation von DNA-Schäden zurückführten.

Bei Betrachtung der **sporadischen Adenome** fand sich wie bei den Colitis-assoziierten Dysplasien, eine deutlich verminderte p21^{WAF1}-Gesamt-Expression sowie eine beginnend aufgehobene zonale Verteilung (Tab. 10; Abb. 16-21). Doglioni et al. sahen bei ihren Untersuchungen an sporadischen Adenomen ein gleichartiges Bild⁵⁹. Die p21^{WAF1}-Expression der **sporadischen Karzinome** war gegenüber den Kontrollen reduziert, lag aber leicht über jener der sporadischen Adenome (Tab. 10; Abb. 16-21). Auch Ioachim et al. konnten eine Reduktion der p21^{WAF1}-Expression bei Fällen mit sporadischen kolorektalen Karzinomen zeigen¹⁰⁴. Mit zunehmendem Tumorstadium sahen wir eine geringe, tendenzielle Reduktion der p21^{WAF1}-Expression (Tab. 8; Abb. 16-21). Ebenso wie wir fand die Arbeitsgruppe um Yasui eine verminderte p21^{WAF1}-Expression bei sporadischen kolorektalen Adenomen und Karzinomen, wobei p21^{WAF1} bei den Karzinomen höher exprimiert war als bei den Adenomen³¹¹. Außerdem konnten sie eine Abnahme der p21^{WAF1}-Expression mit steigendem Tumorstadium dokumentieren. Die Arbeitsgruppe um Ropponen konnte bei der immunhistologischen Untersuchung von 162 sporadischen kolorektalen Karzinomen eine mäßige bis kräftige p21^{WAF1}-Expression bei 33% der Tumoren nachweisen, ein Vergleich zu

tumorfreier Schleimhaut wurde jedoch nicht durchgeführt²²⁸. Frühe Tumorstadien zeigten hier verglichen mit fortgeschrittenen Tumoren eine deutlich höhere Expression. Des Weiteren war eine hohe p21^{WAF1}-Expression mit einer besseren Prognose assoziiert. Dies konnten auch Doglioni et al. bestätigen⁵⁹. Untersuchungen an nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen erbrachten ein gleichartiges Ergebnis mit Assoziation der p21^{WAF1}-Expression sowohl mit frühen Tumorstadien als auch mit einer besseren Prognose^{139 255}. Die hier vorgestellten Ergebnisse decken sich mit der Annahme, dass p21^{WAF1} als Tumorsuppressor fungiert und bei prämaligen und malignen Läsionen eine Störung der Zellzyklus-Kontrolle vorliegt, weshalb hier, trotz entstandenem DNA-Schaden, kein Zellzyklus-Arrest eingeleitet wird. Auch einige Mausmodelle mit p21^{WAF1}-Knockout weisen auf eine tumorsuppressive Funktion von p21^{WAF1} hin^{176 218}.

Anstieg der Proliferation bei aktiver Colitis ulcerosa und neoplastischer Transformation

Um die Veränderungen der proliferativen Aktivität zu bestimmen, nutzten wir den gut etablierten Proliferationsmarker Ki67. Passend zu dem oben beschriebenen Regenerationsmuster der Kolonkrypte und im Einklang mit anderen immunhistologischen Arbeiten, zeigten die entzündungsfreien **Kontrollen** in unseren Untersuchungen eine starke Ki67-Positivität im unteren Kryptendrittel, wobei die am Scheitelpunkt der Krypte lokalisierten Stammzellen teils Ki67-negativ waren (Tab. 10; Abb. 22-27)^{135 5 220 54 55 59 280}. Bei dem Kollektiv der **aktiven Colitis** konnten wir einen signifikanten Anstieg der Ki67-Rate beobachten, der auf eine Zunahme Ki67-positiver Zellen im mittleren und apikalen Kryptendrittel zurückging (Tab. 10; Abb. 22-26). Diese Zunahme lässt sich durch eine verstärkte Epithelproliferation im Rahmen der Reparatur entzündlich bedingter Schleimhautverletzungen erklären¹⁶⁷. Bei Colitis in **Remission** war gegenüber der aktiven Colitis eine deutliche Abnahme der Ki67-Rate im Sinne einer partiellen Normalisierung der Proliferationsrate zu erkennen (Tab 10; Abb. 22-26). Allerdings lag die Ki67-Rate weiterhin über jener der Kontrollen, was sich mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Buczyński et al. deckt²⁸. Auch immunhistologische Untersuchungen an der Kolonschleimhaut mit anderen Proliferationsmarkern wie PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) kamen zu dem Ergebnis, dass die proliferative Aktivität bei entzündungsfreier Kontrollschleimhaut im unteren Kryptendrittel lokalisiert ist, bei aktiver CU deutliche ansteigt und sich bei Remission weitgehend normalisiert⁶⁷. Andere Arbeiten konnten wie wir einen fortbestehend erhöhten zellulären Umsatz mit erhöhter Proliferation bei Remission nachweisen²⁴⁷. Mit zunehmender Entzündungsaktivität und -chronizität kam es zu einem signifikanten Anstieg der Ki67-Rate (Tab. 11)²⁹⁴. Auch bei infektiösen Colitiden zeigte sich eine erhöhte Ki67-Expression im Rahmen der entzündungsbedingt vermehrten Proliferation^{15 167}. Es wird vermutet, dass der erhöhte Epithelumsatz bei Infektionen neben

der Reparatur dazu dient, infizierte, erregert tragende Zellen zu eliminieren. Die Frage ist, ob die erhöhte proliferative Aktivität bei Remission noch durch reparative Vorgänge erklärbar ist oder ob sich hier bereits eine pathologisch vermehrte Proliferation zeigt. Immerhin können Wachstumssignale, die bei entzündungsbedingten Gewebsschäden zur Wundheilung ausgeschüttet werden, auch zu einer vermehrten Proliferation von unter Umständen geschädigten Zellen und prämaligen Zellen führen¹⁴². Dieser Effekt wird umso stärker, je häufiger sich die Abfolge von Verletzung und Regeneration wiederholt, was auch in dem zellulären Colitis-Modell gezeigt werden konnte^{215 214}. Auch Mausmodelle mit DSS-induzierter Colitis und anderen entzündlichen Veränderungen des Kolons zeigten eine erhöhte Ki67-Expression in der Regenerationsphase^{136 313}.

In Übereinstimmung mit der Literatur, stellte sich auch bei den hier vorliegenden Untersuchungen eine signifikant erhöhte Proliferation bei den **Colitis-assoziierten Dysplasien** und den **sporadischen Adenomen** dar, die mit einer Auflösung der zonalen Verteilung einher ging (Tab. 10; Abb. 22-26)^{280 5 302 55 58}. Bei den Colitis-assoziierten Dysplasien ließ sich ein Einfluss des Grades der Dysplasie auf die Ki67-Expression ablesen (Tab. 12). Dies deckt sich mit Studien, die zeigten, dass Ki67 sowohl bei der Abgrenzung entzündungsbedingter, reaktiver Atypien bei CU von echten Colitis-assoziierten Dysplasien sowie bei der Graduierung der Dysplasien genutzt werden kann³⁰². Bei den **Colitis-assoziierten Karzinomen** und auch den **sporadischen Karzinomen** kam es, in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, zu einem weiteren Anstieg der Ki67-Rate, mit einer diffusen Verteilung Ki67-positiver Tumorzellen innerhalb des Tumors (Tab. 10; Abb. 22-26)^{5 14 54 58 190 208 263}. Auch Principi et al. konnten einen kontinuierlichen Anstieg der Ki67-Expression von der aktiven Colitis über die Colitis-assoziierten Dysplasien zu den Colitis-assoziierten Karzinomen feststellen²²⁰. Interessanterweise zeigten die von uns untersuchten sporadischen kolorektalen Karzinome eine höhere Ki67-Expression als die Colitis-assoziierten Karzinome (Tab. 10, Abb. 22-26). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die sporadischen Karzinome durchschnittlich ein fortgeschritteneres Tumor-Stadium aufwiesen als die Colitis-assoziierten Karzinome (Tab. 7 und 8).

Es existieren zahlreiche Studien, die eine erhöhte Ki67-Rate in diversen Malignomen beschreiben und zeigen, dass die Ki67-Rate in einer Vielzahl von Malignomen von beispielsweise Mamma, Prostata und Lunge sowie in Lymphomen, einen starken prognostischen und prädiktiven Wert hat^{106 46 115 259 312 284 110 314 211 79 194}. Hier korreliert eine hohe Ki67-Expression zumeist mit einer hohen Tumoraggressivität und somit mit einer schlechteren Prognose^{138 25 102 17 12}. Untersuchungen am **kolorektalen Karzinom** kamen teils zu widersprüchlichen Ergebnissen, wobei die Ki67-Rate beim kolorektalen Karzinom zwar erhöht war, sich aber kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Tumorstadium oder der

Prognose herstellen ließ^{25 203 144 14 73}. Dies deckt sich mit den in der hier vorgestellten Arbeit beschriebenen Ergebnissen.

Bei Betrachtung des Verlaufs der Gesamt-Ki67-Rate von den Kontrollen über die aktive Colitis, die Remission, die Colitis-assoziierten Dysplasien zu den Colitis-assoziierten Karzinomen lässt sich vergleichbar zum zellulären Colitis -Modell, ein sinusoidales Muster mit Proliferationsmaxima bei der aktiven Colitis, den Dysplasien und den Karzinomen erkennen²¹⁵ (Abb. 22 und 23).

p21^{WAF1} und Ki67 korrelieren invers

Da der durch p21^{WAF1} ausgelöste Zellzyklus-Arrest zu einem Stopp der Zellproliferation führt und zusätzlich die Differenzierung von Zellen ermöglicht^{160 296 168}, waren p21^{WAF1} und Ki67 bei unseren Untersuchungen größtenteils invers korreliert (Tab. 10; Abb. 16, 22 und 27). So zeigte sich in den Krypten der gesunden **Kontrollen** wie oben beschrieben, eine an der Kryptenbasis hohe Ki67-Rate und eine im oberen Kryptendrittel und dem Oberflächenepithel hohe p21^{WAF1}-Expression. Bei **aktiver Colitis** sahen wir einen Anstieg der p21^{WAF1}-Expression, was die Einleitung des Zellzyklus-Arrestes bewirken und so die Reparatur, der auch durch γ -H2AX angezeigten, entzündlich bedingten DNA-Schäden ermöglichen könnte. Gleichzeitig konnten wir jedoch auch eine vermehrte Proliferationsrate in Form einer erhöhten Ki67-Rate nachweisen. Bei den **Colitis-assoziierten Dysplasien und Karzinomen** fand sich wieder eine inverse Korrelation mit Absinken der p21^{WAF1}-Gesamt-Expression bei gleichzeitigem Anstieg der Ki67-Rate. Beide Marker ließen eine von den Dysplasien zu den Karzinomen zunehmende Auflösung der zonalen Verteilung erkennen (Tab. 10; Abb. 16 und 22). Eine gleichartige Entwicklung fand sich bei den **sporadischen kolorektalen Adenomen und Karzinomen** (Tab. 10; Abb. 16 und 22). Im Gegensatz zu Doglioni et al., die beim kolorektalen Karzinom keine Korrelation der beiden Marker miteinander sahen⁵⁹, konnten wir eine gegenläufige Entwicklung mit Abnahme der p21^{WAF1}-Expression bei gleichzeitigem Anstieg der Ki67-Expression verzeichnen.

Eine fehlregulierte JNK-Aktivität könnte ein Umschalten von Zellzyklus-Arrest zu vermehrter Proliferation bewirken

JNK spielt bei der Pathogenese verschiedener Malignome des Menschen eine wichtige Rolle^{27 274 39 290 56}. Pöhlmann et al. konnten im zellulären Colitis-Modell nachweisen, dass es nach einer p-JNK-Erhöhung bei der aktiven Colitis zu einer Fehlregulation der p-JNK-Expression mit verminderter p-p54-JNK- und erhöhter p-p46-JNK-Expression in der CU-assoziierten Karzinogenese, kommt, die bei der Colitis in Remission beginnt^{214 215}. Konsekutiv wurden p21^{WAF1} und γ -H2AX herunterreguliert, was eine Fehlsteuerung der DNA-Schadens-Antwort mit folglich vermehrter Proliferation und maskiertem DNA-Schaden nach sich zog (Abb. 5).

In den hier vorliegenden immunhistologischen Untersuchungen konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von p-JNK2, p-JNK123, γ -H2AX und p21^{WAF1} bei aktiver Colitis beobachtet werden (Tab. 4). Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass sich ein großer Teil der Kolonepithelzellen in einem **Zellzyklus-Arrest** befand, ausgelöst durch entzündungsbedingten Zell-Stress. Aufgrund der parallelen Entwicklung der Proteinexpression und der Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen vermuten wir, dass p-JNK auch *in vivo* über eine p21^{WAF1}- und γ -H2AX-Erhöhung die Einleitung des Zellzyklus-Arrestes bewirkt. Diese These wird von Studien gestützt, die zeigen, dass JNK sowohl unter Normal- als auch unter Stressbedingungen einen Einfluss auf den Zellzyklus hat, indem es unter anderem p21^{WAF1} und p53 durch Phosphorylierung stabilisiert^{134 31} oder eine Transkription von p21^{WAF1} über Transaktivierung des Transkriptionsfaktors Sp1 bewirkt^{120 246}. Zusätzlich kann JNK auch die Phosphorylierung von H2AX induzieren^{215 162}. Da wir parallel eine erhöhte Ki67-Rate nachweisen konnten, ist zusätzlich anzunehmen, dass ein zweiter Teil der Epithelzellen proliferierte (Tab. 10; Abb. 22 und 23). Ein gleichartiger Proliferationsanstieg fand sich auch in der akuten Entzündungsphase des zellulären Colitis-Modells^{215 214}. Naheliegender scheint, dass die **Proliferation hier im Rahmen der Wundheilung** erhöht ist¹⁶⁷. Auch bei Remission war eine erhöhte proliferative Aktivität zu beobachten. Die Frage ist, ob diese noch durch reparative Vorgänge erklärbar ist, oder ob sie bereits – wie im zellulären Colitis-Modell gezeigt²¹⁵ – Ausdruck einer **beginnenden Fehlsteuerung des Zellzyklus** ist (Tab. 10; Abb. 22 und 23), bei der geschädigte Zellen vermehrt die Zellzyklus-Kontrollpunkte überwinden, wie es im zellulären Colitis-Modell gezeigt werden konnte²¹⁵. Als Ursache dieser Fehlsteuerung konnten Pöhlmann et al. die beschriebene JNK-Fehlregulation nachweisen²¹⁵. Im Einklang mit diesem Modell sahen wir bei Remission, den Colitis-assoziierten Dysplasien und den Colitis-assoziierten Karzinomen eine signifikante Verminderung der p-JNK2-Expression (Tab. 4; Abb. 9 und 10). Gleichzeitig war eine Erhöhung von p-JNK123 bei Remission und den Colitis-assoziierten Dysplasien zu verzeichnen (Tab. 4; Abb. 11 und 12). Zwar muss man einräumen, dass der uns zur Verfügung stehende p-JNK123-Antikörper keine spezifische Beurteilung der p-JNK1-Expression erlaubte, dennoch war das beschriebene differente Verhalten von p-JNK2 und p-JNK123 in der Colitis-assoziierten Karzinogenese zu beobachten, welches an die Expressionsmuster in der Zellkultur erinnert und auf eine mögliche Fehlregulation der JNK-Isoformen *in vivo* hinweist²¹⁵. Des Weiteren konnte, ebenso wie in dem zellulären Colitis-Modell beschrieben, auch *in vivo* beobachtet werden, dass die p21^{WAF1}-Expression während der Colitis-assoziierten Karzinogenese parallel zu p-JNK2 abnahm (Tab. 10, Abb. 16 - 21). p21^{WAF1} könnte in dem hier betrachteten Zusammenhang durch p-JNK2 reguliert werden. Dagegen sprechen allerdings Arbeiten an Maus- und Zellkulturmodellen zum Gastrointestinaltrakt, die eine JNK1-abhängige Aktivierung von p21^{WAF1} mit konsekutiver

Tumor-supprimierender Wirkung für JNK1 sahen^{273 258}.

Sowohl Pöhlmann et al. als auch Lu et al. konnten belegen, dass γ -H2AX von JNK reguliert werden kann^{215 162}. Da sich im Vergleich zu den sporadischen kolorektalen Neoplasien bei den Colitis-assoziierten Neoplasien nur ein geringer Anstieg von γ -H2AX beobachten ließ (Abb. 4; Tab. 13 und 14), vermuten wir in Anlehnung an das zelluläre Colitis-Modell, dass diese gegenüber den sporadischen kolorektalen Karzinomen signifikant verminderte γ -H2AX-Expression ein Hinweis auf einen **maskierten DNA-Schaden** ist und möglicherweise durch die postulierte JNK-Fehlregulation bedingt sein könnte.

Zusammenfassend ist zu vermuten, dass die in der hier vorgestellten Arbeit beobachtete Verminderung der p-JNK2-Expression und Erhöhung der p-JNK123-Expression mit der p21^{WAF1}-Verminderung und einer erhöhten Proliferation korreliert sein könnten und sich zusätzlich ein maskierter DNA-Schaden bei JNK-abhängig verminderter γ -H2AX-Expression findet. Dieses Zusammenspiel an Veränderungen führt möglicherweise zu einer Fehlregulation der Zellzyklus-Kontrolle in der CU-assoziierten Karzinogenese. Einschränkend muss man jedoch anmerken, dass die CU eine komplexe Erkrankung darstellt, bei der diverse pathogenetische und molekulare Mechanismen ineinander greifen. So wird unter anderem vermutet, dass hier auch komplexe Störungen der Schleimhautbarriere vorliegen¹¹³. Diese gehen unter anderem auf Veränderungen des Wnt- und Notch-Signalweges zurück, welcher Einfluss auf die Funktion von Paneth- und Becherzellen und so die antimikrobielle Abwehr hat^{112 191}.

Spezifische Effekte der Colitis ulcerosa-assoziierten Entzündung

Um die Auswirkungen der CU-spezifischen Entzündung auf die Kolonschleimhaut objektivieren zu können, haben wir zum Vergleich Fälle mit Sigmadivertikulitis untersucht. Die Sigmadivertikulitis ist eine partiell chronisch und oft auch rezidivierend verlaufende Entzündung der Kolonschleimhaut, die jedoch nicht mit einer Erhöhung des Karzinomrisikos einhergeht^{71 242}. Interessanterweise zeigte sich die p-JNK2- und p-JNK123-Expression bei der **Divertikulitis** nicht wie bei aktiver Colitis, erhöht sondern lag weit unter jener der Kontrollen (Tab. 4; Abb. 9-12). Passend dazu war eine Verminderung der Gesamt-p21^{WAF1}-Expression und der p21^{WAF1}-Expression im mittleren und apikalen Kryptendrittel zu beobachten (Tab. 10; Abb. 16-21). Lediglich im basalen Kryptendrittel kam ein minimaler Anstieg der p21^{WAF1}-Expression verglichen mit den Kontrollen zur Darstellung. Dieser lag jedoch weit unter dem bei aktiver Colitis zu verzeichnenden Expressionsanstieg (Tab. 10; Abb. 16-21). Aufgrund dieser Unterschiede vermuten wir, dass der **JNK-Signalweg spezifisch bei der CU-assoziierten Entzündung aktiviert** wird. Ein weiterer Unterschied zur CU ist die proliferative Aktivität, die bei aktiver Colitis über alle Kryptenabschnitte deutlich erhöht war. Bei Divertikulitis war lediglich im apikalen Kryptendrittel eine signifikante

Proliferationssteigerung zu erkennen (Tab. 10; Abb. 22-26). Die Frage ist, ob der JNK-Signalweg tatsächlich speziell bei CU aktiviert wird oder ob hier nicht ein im Vergleich zur Divertikulitis deutlich stärkerer Gewebsschaden vorliegt, der dementsprechend eine stärkere Stressreaktion in Form einer stärkeren JNK-Aktivierung nach sich zieht. Dagegen spricht zunächst, dass bei Divertikulitis, wie beschrieben, nicht nur eine Erhöhung der betreffenden Proteine ausblieb sondern diese im Gegenteil erniedrigt waren. Außerdem waren die Einschlusskriterien für die Fälle beider Kollektive identisch. Bei beiden Kollektiven wurden ausschließlich Fälle ausgewählt, deren Schleimhaut frei von Erosionen oder Ulzerationen war, um eine Auswertung des Epithels auf gesamter Kryptenlänge zu ermöglichen. Für einen stärkeren Gewebsschaden bei aktiver CU spricht jedoch, dass die Entzündungsaktivität bei der aktiven Colitis durchschnittlich höher war als bei der Divertikulitis. Bei aktiver Colitis zeigten 90,5% der Fälle eine mäßige oder starke Aktivität, bei der Divertikulitis nur 50% (Tab. 1). Außerdem könnte die bei aktiver Colitis gesteigerte Proliferation auf eine stärkere Regeneration bei Epithelschaden hinweisen. Allerdings konnte für die Sigmadivertikulitis kein statistischer Zusammenhang zwischen der Entzündungsaktivität und der proliferativen Aktivität sowie der Expression von p-JNK2, p-JNK123, p21^{WAF1} oder γ -H2AX nachgewiesen werden. Statistisch relevante Auswirkungen auf die Proteinexpression fanden sich nur innerhalb des Colitis-Kollektivs selbst. Ein weiterer Fakt, der gegen eine ausschließlich durch vermehrten Gewebsschaden bedingte JNK-Aktivierung spricht, ist die bei Divertikulitis im Vergleich zur aktiven Colitis stärker erhöhte Expression des DNA-Schadensmarkers γ -H2AX (Tab. 4; Abb. 13 und 14). Somit liegen auch im Epithel der Divertikulitis vermutlich entzündlich bedingte Schäden der DNA vor. Da die p-JNK-Expression reduziert war, ist davon auszugehen, dass JNK-unabhängige Signalwege γ -H2AX induziert haben. Leider liegen keine Arbeiten zur Expression von p-JNK, p21^{WAF1}, γ -H2AX oder Ki67 bei Sigmadivertikulitis vor, mit denen wir unsere Ergebnisse vergleichen könnten. Ausblickend, wären Vergleiche mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen der Kolonschleimhaut wie Morbus Crohn hilfreich, um die Rolle des JNK-Signalweges hier besser zu verstehen.

Beim **Vergleich der sporadischen mit den Colitis-assoziierten intraepithelialen Neoplasien** zeigte sich, dass die Expression von p-JNK123 bei den Colitis-assoziierten Dysplasien signifikant höher war als die p-JNK2-Expression, wohingegen sich bei den sporadischen Adenomen lediglich ein marginaler Unterschied zwischen der p-JNK123- und der p-JNK2-Expression fand (Tab. 4). Die Differenz zwischen den Unterschieden der Proteinexpression der beiden Kollektive war statistisch signifikant. Wie oben erörtert, kann die Erhöhung der p-JNK123-Expression bei den Colitis-assoziierten Dysplasien möglicherweise auf eine **erhöhte p-JNK1-Expression** zurückgeführt werden. Eine Erhöhung von p-p46-JNK fand sich auch in dem zellulären Colitis-Modell und schien durch den rezidivierenden oxidativen Stress bedingt zu sein ²¹⁵. γ -H2AX wies in den Colitis-

assoziierten Dysplasien und den sporadischen Adenomen ein nahezu identisches Expressions-Niveau auf (Tab. 4; Abb. 13 und 14). Bei den **sporadischen kolorektalen Karzinomen** zeigte die γ -H2AX-Expression jedoch verglichen mit den Colitis-assoziierten Karzinomen einen nahezu zweifachen Wert (Tab. 4; Abb. 13 und 14). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass der auch beim Colitis-assoziierten Karzinom zu vermutende DNA-Schaden nicht vollständig durch γ -H2AX signalisiert wird und demnach maskiert ist. Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit den Untersuchungen am zellulären Colitis-Modell²¹⁵. Ein Einfluss des Patientenalters, welches den γ -H2AX-Spiegel auch verändern kann²⁶¹, konnte trotz durchschnittlich höherem Alter bei den Fällen mit sporadischen kolorektalen Karzinomen statistisch nicht nachgewiesen werden (Tab. 13), sodass die vorbestehende Entzündung als mögliche Ursache für den niedrigeren γ -H2AX-Wert bei den Colitis-assoziierten Karzinomen in Frage kommt. Dazu passt, dass die Arbeitsgruppe um Oka et al. bei der Progression der sporadischen kolorektalen Karzinogenese eine aktivierte DNA-Schadens-Antwort mit erhöhten γ -H2AX-, p-ATM- und p-Chk2-Werten nachweisen konnte²⁰⁵. Interessanterweise war die p21^{WAF1}-Expression bei den sporadischen Karzinomen zwar gegenüber den Kontrollen reduziert, lag aber signifikant über jener der Colitis-assoziierten Karzinome und sogar leicht über jener der sporadischen Adenome, was die beschriebene These einer aufgrund der chronischen Entzündung verstärkt gestörten Zellzyklus-Kontrolle weiter untermauert (Tab. 10; Abb. 16-21)

Ausblick

Insgesamt hat das zelluläre Colitis-Modell weitere molekulare Mechanismen der Colitis-assoziierten Karzinogenese aufgedeckt (Abb. 5), die wir in der hier vorliegenden Arbeit an Patientenmaterial immunhistologisch bestätigen konnten. Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse kann postuliert werden, dass p21^{WAF1} auch *in vivo* durch p-JNK reguliert werden kann und dass die Colitis-assoziierte Entzündung zu einer spezifischen JNK-Aktivierung mit Einleitung eines Zellzyklus-Arrestes führt. Des Weiteren vermuten wir, dass mit fortschreitendem Krankheitsverlauf eine JNK-Fehlregulation auftritt, welche durch eine verminderte p21^{WAF1}-Expression zu einer Überwindung von Zellzyklus-Kontrollpunkten und daraufhin pathologisch vermehrter Proliferation führt. Zusätzlich konnte eine Reduktion des DNA-Schadensmarkers γ -H2AX bei den Colitis-assoziierten Neoplasien im Vergleich zu den sporadischen kolorektalen Neoplasien beobachtet werden, wobei es sich hier um einen Ausdruck maskierter DNA-Schäden handeln könnte, der möglicherweise spezifisch für die Colitis-assoziierte Karzinogenese ist. Um die hier vorgelegten Daten zu verifizieren, wären weitere *in vivo* Untersuchungen mit größeren Kohorten sowie weitere, spezifische JNK-Inhibitor-Analysen wünschenswert.

5 Zusammenfassung

Die Colitis ulcerosa (CU) ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die mit einer stark erhöhten Inzidenz an kolorektalen Karzinomen einhergeht. Bei der zellulären Reaktion auf entzündlichen Stress spielen c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) eine wesentliche Rolle. Sie haben Einfluss auf zelluläre Funktionen wie Zellzyklus-Kontrolle und Proliferation. Pöhlmann et al. konnten zuvor mittels eines Zellkultur-Modells eine Fehlregulation der p-JNK-Expression im Rahmen einer chronischen Exposition gegenüber oxidativem Stress nachweisen und zusätzlich zeigen, dass diese mit einer pathologischen Verminderung des Zellzyklus-Regulators p21^{WAF1} und des DNA-Schadensmarkers γ -H2AX assoziiert war.

Die vorliegende Arbeit überprüft, ob Veränderungen des JNK-Signalweges auch *in vivo* eine Rolle spielen. Dazu wurden immunhistologische Untersuchungen der identifizierten Signalproteine p-JNK, p21^{WAF1}, γ -H2AX und des Proliferationsmarkers Ki67 an Kolon-Biopsien und -Resektaten von Patienten mit aktiver CU, CU in Remission, CU-assoziierten Dysplasien und CU-assoziiertem Karzinom durchgeführt. Zum Vergleich wurden Biopsien und Resektate von entzündungsfreier Kolonschleimhaut, Sigmadivertikulitiden, sporadischen Adenomen und sporadischen kolorektalen Karzinomen herangezogen. Es konnte ein Anstieg der p-JNK2- und p21^{WAF1}-Expression bei aktiver CU und eine Reduktion der p-JNK2- und p21^{WAF1}-Expression sowohl bei der CU-assoziierten als auch bei der sporadischen kolorektalen Karzinogenese beobachtet werden. Die p21^{WAF1}-Verminderung weist auf eine verminderte Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten, also einen partiell aufgehobenen Zellzyklus-Arrest hin. Invers dazu zeigte sich eine erhöhte proliferationsassoziierte Ki67-Rate in der CU-assoziierten und der sporadischen kolorektalen Karzinogenese. Die Expression von p-JNK123 stieg in der aktiven CU und der CU in Remission und sank erst beim CU-assoziierten Karzinom auf den Wert der p-JNK2-Expression. Der γ -H2AX-Wert lag bei den CU-assoziierten Neoplasien signifikant unter dem der sporadischen kolorektalen Neoplasien. Das deutet darauf hin, dass die CU-assoziierte Entzündung über eine pathologische Verminderung von γ -H2AX zu einer Maskierung des DNA-Schadens führt. Wir vermuten, dass bei aktiver CU ein JNK-abhängiger Zellzyklus-Arrest eingeleitet wird. Die chronische Entzündung wiederum könnte eine fehlregulierte JNK-Aktivität mit verminderter p-JNK2-Expression bewirken. Diese scheint sich beginnend in Remission zu manifestieren und während der CU-assoziierten Karzinogenese zu einer fehlerhaften Zellzyklus-Kontrolle, einer erhöhten Proliferation und einem undetektierten DNA-Schaden beizutragen.

6 Literaturverzeichnis

1. „[Telaprevir-benefit assessment of the Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG) in accordance with § 35a SGB V (dosing evaluation)].“ *Z Gastroenterol.* 2012;50(3):271-272.
2. Adhikari N et al. „Transcription factor and kinase-mediated signaling in atherosclerosis and vascular injury.“ *Curr Atheroscler Rep.* 2006;8(3):252-260.
3. Arai N et al. „Enhanced epithelial cell turnover associated with p53 accumulation and high p21WAF1/CIP1 expression in ulcerative colitis.“ *Mod Pathol.* 1999;12(6):604-611.
4. Assi K et al. „The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis.“ *Immunology.* 2006;118(1):112-121.
5. Baker AM et al. „Distribution of the c-MYC gene product in colorectal neoplasia.“ *Histopathology.* 2016;69(2):222-229.
6. Bakiri L et al. „Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression.“ *EMBO J.* 2000;19(9):2056-2068.
7. Baldassarre G et al. „Linking inflammation to cell cycle progression.“ *Curr Pharm Des.* 2004;10(14):1653-1666.
8. Bantel H et al. „Critical role of NF-kappaB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness.“ *FASEB J.* 2002;16(13):1832-1834.
9. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. „DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression.“ *Oncogene.* 2007;26(56):7773-7779.
10. Bartek J, Lukas J. „Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage.“ *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(6):738-747.
11. Bartek J, Lukas J. „Cell cycle. Order from destruction.“ *Science.* 2001;294(5540):66-67.
12. Basilio-de-Oliveira RP, Pannain VL. „Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors.“ *World J Gastroenterol.* 2015;21(22):6924-6930.
13. Bennett BL et al. „SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase.“ *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13681-13686.
14. Berenzi A et al. „Ki67 immunohistochemical evaluation in colorectal cancer and normal colonic mucosa. Possible clinical applications.“ *Pathologica.* 1992;84(1090):155-163.
15. Bergstrom KS et al. „Goblet Cell Derived RELM-β Recruits CD4+ T Cells during Infectious Colitis to Promote Protective Intestinal Epithelial Cell Proliferation.“ *PLoS Pathog.* 2015;11(8):e1005108.
16. Bernstein CN, Shanahan F, Weinstein WM. „Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis.“ *Lancet.* 1994;343(8889):71-74.

17. Blancato J et al. „Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses.“ *Br J Cancer*. 2004;90(8):1612-1619.
18. Bogoyevitch MA. „The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting.“ *Bioessays*. 2006;28(9):923-934.
19. Bogoyevitch MA, Arthur PG. „Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JunK no more.“ *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(1):76-93.
20. Bogoyevitch MA, Kobe B. „Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases.“ *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(4):1061-1095.
21. Bonner WM et al. „GammaH2AX and cancer.“ *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):957-967.
22. Borsello T et al. „A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia.“ *Nat Med*. 2003;9:1180-1186.
23. Brentnall TA et al. „Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis.“ *Cancer Res*. 1996;56(6):1237-1240.
24. Bridger JM, Kill IR, Lichter P. „Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells.“ *Chromosome Res*. 1998;6(1):13-24.
25. Brown DC, Gatter KC. „Ki67 protein: the immaculate deception.“ *Histopathology*. 2002;40(1):2-11.
26. Brugarolas J et al. „Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency.“ *Nature*. 1995;377(6549):552-557.
27. Bubici C, Papa S. „JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets.“ *Br J Pharmacol*. 2014;171(1):24-37.
28. Buczyński J et al. „Higher apoptosis index and proliferation index in colonocytes of patients with ulcerative colitis in remission.“ *Pol Przegl Chir*. 2012;84(6):271-275.
29. Bulut G et al. „Effects of jnk inhibitor on inflammation and fibrosis in the ovary tissue of a rat model of polycystic ovary syndrome.“ *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:8774-8785.
30. Burma S et al. „ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks.“ *J Biol Chem*. 2001;276(45):42462-42467.
31. Buschmann T et al. „Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress.“ *Mol Cell Biol*. 2001;21(8):2743-2754.
32. Castro LA et al. „Long-term effects of nifedipine on human gingival epithelium: a histopathological and immunohistochemical study.“ *J Oral Sci*. 2010;52(1):55-62.
33. Cerutti PA, Trump BF. „Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis.“ *Cancer Cells*. 1991;3(1):1-7.
34. Chan TK et al. „House dust mite-induced asthma causes oxidative damage and DNA double-strand breaks in the lungs.“ *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):84-96.e1.

35. Chang Q et al. „JNK1 activation predicts the prognostic outcome of the human hepatocellular carcinoma.“ *Mol Cancer*. 2009;8:64.
36. Chang Q et al. „Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer.“ *J Hepatol*. 2009;50(2):323-333.
37. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. „The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.“ *Gastroenterology*. 2011;140(6):1720-1728.
38. Chaubert P et al. „K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis.“ *Am J Pathol*. 1994;144(4):767-775.
39. Chen F. „JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells.“ *Cancer Res*. 2012;72(2):379-386.
40. Chen F et al. „IRF1 suppresses Ki-67 promoter activity through interfering with Sp1 activation.“ *Tumour Biol*. 2012;33(6):2217-2225.
41. Chen N et al. „Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice.“ *Cancer Res*. 2001;61(10):3908-3912.
42. Chen YR, Tan TH. „The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review).“ *Int J Oncol*. 2000;16(4):651-662.
43. Chowdhury D et al. „gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair.“ *Mol Cell*. 2005;20(5):801-809.
44. Chowdhury D et al. „A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication.“ *Mol Cell*. 2008;31(1):33-46.
45. Chromik AM et al. „Genetic deletion of JNK1 and JNK2 aggravates the DSS-induced colitis in mice.“ *J Invest Surg*. 2007;20(1):23-33.
46. Ciancio N et al. „Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer.“ *Multidiscip Respir Med*. 2012;7(1):29.
47. Claudio PP et al. „Expression of cell-cycle-regulated proteins pRb2/p130, p107, p27(kip1), p53, mdm-2, and Ki-67 (MIB-1) in prostatic gland adenocarcinoma.“ *Clin Cancer Res*. 2002;8(6):1808-1815.
48. Cohen PS et al. „CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):3967-3971.
49. Corvinus FM et al. „Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth.“ *Neoplasia*. 2005;7(6):545-555.
50. Courtois G, Gilmore TD. „Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease.“ *Oncogene*. 2006;25(51):6831-6843.
51. Coussens LM, Werb Z. „Inflammation and cancer.“ *Nature*. 2002;420(6917):860-867.

52. Cui J et al. „JNK pathway: diseases and therapeutic potential.“ *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(5):601-608.
53. Dahan S et al. „Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation.“ *Gastroenterology.* 2008;134(1):192-203.
54. Dame MK et al. „Human colon tissue in organ culture: preservation of normal and neoplastic characteristics.“ *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(2):114-122.
55. Dame MK et al. „Human colonic crypts in culture: segregation of immunochemical markers in normal versus adenoma-derived.“ *Lab Invest.* 2014;94(2):222-234.
56. Das M et al. „The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma.“ *Genes Dev.* 2011;25(6):634-645.
57. Davis RJ. „Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.“ *Cell.* 2000;103(2):239-252.
58. Diebold J et al. „Comparison of different monoclonal antibodies for the immunohistochemical assessment of cell proliferation in routine colorectal biopsy specimens.“ *Scand J Gastroenterol.* 1994;29(1):47-53.
59. Doglioni C et al. „p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation.“ *J Pathol.* 1996;179(3):248-253.
60. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. „MAP kinases in the immune response.“ *Annu Rev Immunol.* 2002;20:55-72.
61. Dotan I et al. „A randomised placebo-controlled multicentre trial of intravenous semapimod HCl for moderate to severe Crohn’s disease.“ *Gut.* 2010;59(6):760-766.
62. Durbin AD et al. „JNK1 determines the oncogenic or tumor-suppressive activity of the integrin-linked kinase in human rhabdomyosarcoma.“ *J Clin Invest.* 2009;119(6):1558-1570.
63. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. „The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis.“ *Gut.* 2001;48(4):526-535.
64. Ehedego H et al. „p21 ablation in liver enhances DNA damage, cholestasis, and carcinogenesis.“ *Cancer Res.* 2015;75(6):1144-1155.
65. Ekbohm A et al. „The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden.“ *Gastroenterology.* 1991;100(2):350-358.
66. el-Deiry WS et al. „WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.“ *Cell.* 1993;75(4):817-825.
67. Ierardi E. „Epithelial Proliferation and ras p21 Oncoprotein Expression in Rectal Mucosa of Patients with Ulcerative Colitis.“ *Digestive Diseases and Sciences.* 2001;1083.

68. Farmer RG, Easley KA, Rankin GB. „Clinical patterns, natural history, and progression of ulcerative colitis. A long-term follow-up of 1116 patients.“ *Dig Dis Sci*. 1993;38(6):1137-1146.
69. Fernandez-Capetillo O et al. „H2AX: the histone guardian of the genome.“ *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):959-967.
70. Fleisher AS et al. „Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1.“ *Cancer Res*. 2000;60(17):4864-4868.
71. Floch MH, Longo WE. „United States Guidelines for Diverticulitis Treatment.“ *J Clin Gastroenterol*. 2016;50 Suppl 1:S53-6.
72. Flossmann E, Rothwell PM. „Commentary: aspirin and colorectal cancer an epidemiological success story.“ *Int J Epidemiol*. 2007;36(5):962-965.
73. Forones NM et al. „[Determination of proliferative activity using Ki67 and expression of p53 in colorectal cancer].“ *Arq Gastroenterol*. 1999;36(3):122-126.
74. Fuchs SY et al. „MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10541-10546.
75. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. „p21--negative regulator of the cell cycle.“ *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996;213(2):138-149.
76. Gartel AL, Tyner AL. „Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene.“ *Exp Cell Res*. 1999;246(2):280-289.
77. Gehringer M et al. „c-Jun N-terminal kinase inhibitors: a patent review (2010 - 2014).“ *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(8):849-872.
78. Gerlach C et al. „Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy.“ *Hepatology*. 1997;26(3):573-578.
79. Golmohammadi R, Pejhan A. „The prognostic value of the P53 protein and the Ki67 marker in breast cancer patients.“ *J Pak Med Assoc*. 2012;62(9):871-875.
80. Greenson JK. „Dysplasia in inflammatory bowel disease.“ *Semin Diagn Pathol*. 2002;19(1):31-37.
81. Greten FR et al. „IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer.“ *Cell*. 2004;118(3):285-296.
82. Grisham MB. „Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease.“ *Lancet*. 1994;344(8926):859-861.
83. Grivennikov SI. „Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia.“ *Semin Immunopathol*. 2013;35(2):229-244.
84. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. „Immunity, inflammation, and cancer.“ *Cell*. 2010;140(6):883-899.

85. Guerra C et al. „Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice.“ *Cancer Cell*. 2007;11(3):291-302.
86. Gupta RB et al. „Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study.“ *Gastroenterology*. 2007;133(4):1099-105; quiz 1340.
87. Gupta S et al. „Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors.“ *EMBO J*. 1996;15(11):2760-2770.
88. Gutierrez GJ et al. „JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint.“ *J Biol Chem*. 2010;285(19):14217-14228.
89. Haeusgen W, Herdegen T, Waetzig V. „The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7.“ *Eur J Cell Biol*. 2011;90(6-7):536-544.
90. Hakem R. „DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly.“ *EMBO J*. 2008;27(4):589-605.
91. Halm U et al. „Apoptosis and cell proliferation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma-sequence of Barrett’s esophagus.“ *Hepatogastroenterology*. 2000;47(34):962-966.
92. Hamilton SR et al. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. IARC press Lyon; 2000
93. Han Z et al. „c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis.“ *J Clin Invest*. 2001;108(1):73-81.
94. Hanahan D, Weinberg RA. „Hallmarks of cancer: the next generation.“ *Cell*. 2011;144(5):646-674.
95. Heasley LE, Han SY. „JNK regulation of oncogenesis.“ *Mol Cells*. 2006;21(2):167-173.
96. Hommes D et al. „Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn’s disease.“ *Gastroenterology*. 2002;122(1):7-14.
97. Hu HY et al. „Clinical significance of Smac and Ki-67 expression in pancreatic cancer.“ *Hepatogastroenterology*. 2012;59(120):2640-2643.
98. Huang SC, Lee CT, Chung BC. „Tumor necrosis factor suppresses NR5A2 activity and intestinal glucocorticoid synthesis to sustain chronic colitis.“ *Sci Signal*. 2014;7(314):ra20.
99. Hui L et al. „Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation.“ *J Clin Invest*. 2008;118(12):3943-3953.
100. Hussain SP et al. „Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease.“ *Cancer Res*. 2000;60(13):3333-3337.
101. Hussain SP, Harris CC. „Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials.“ *Int J Cancer*. 2007;121(11):2373-2380.

102. Ibrahim T et al. „Hormonal receptor, human epidermal growth factor receptor-2, and Ki67 discordance between primary breast cancer and paired metastases: clinical impact.“ *Oncology*. 2013;84(3):150-157.
103. Ichijima Y et al. „Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response.“ *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(3):807-812.
104. Ioachim EE. „Immunohistochemical expression of Cyclin D1, Cyclin E, p21/waf1 and p27/kip1 in inflammatory bowel disease: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, ki-67 and PCNA) and clinicopathological features.“ *Int J Colorectal Dis*. 2004
105. Ip YT, Davis RJ. „Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development.“ *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(2):205-219.
106. Ishihara M et al. „Retrospective analysis of risk factors for central nervous system metastases in operable breast cancer: effects of biologic subtype and Ki67 overexpression on survival.“ *Oncology*. 2013;84(3):135-140.
107. Itoh M et al. „Systemic effects of acute cigarette smoke exposure in mice.“ *Inhal Toxicol*. 2014;26(8):464-473.
108. Itzkowitz SH. „Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease.“ *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35(3):553-571.
109. Jackson AL, Loeb LA. „Microsatellite instability induced by hydrogen peroxide in Escherichia coli.“ *Mutat Res*. 2000;447(2):187-198.
110. Janson ET et al. „Nordic guidelines 2014 for diagnosis and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms.“ *Acta Oncol*. 2014;53(10):1284-1297.
111. Jenkins D et al. „Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative.“ *J Clin Pathol*. 1997;50(2):93-105.
112. Jeon MK et al. „Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers.“ *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2013;4:94-99.
113. Jiao L et al. „Deficiency of Group VIA Phospholipase A2 (iPLA2 β) Renders Susceptibility for Chemical-Induced Colitis.“ *Dig Dis Sci*. 2015;60(12):3590-3602.
114. Johnson GL, Nakamura K. „The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease.“ *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1341-1348.
115. Josefsson A et al. „Low endoglin vascular density and Ki67 index in Gleason score 6 tumours may identify prostate cancer patients suitable for surveillance.“ *Scand J Urol Nephrol*. 2012;46(4):247-257.
116. Junginger T, Hermanek P, Klimpfinger M. *Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts I*. Springer-Verlag; 2013
117. Juríková M et al. „Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer.“ *Acta Histochem*. 2016;118(5):544-552.

118. Kaler P et al. „The NF- κ B/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1 β .“ *Cancer Microenviron.* 2009;2(1):69-80.
119. Kamata H et al. „Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases.“ *Cell.* 2005;120(5):649-661.
120. Kardassis D et al. „c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1.“ *J Biol Chem.* 1999;274(41):29572-29581.
121. Karin M. „The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.“ *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996;351(1336):127-134.
122. Karin M. „Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression.“ *Nature.* 2006;441(7092):431-436.
123. Karin M, Gallagher E. „From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance.“ *IUBMB Life.* 2005;57(4-5):283-295.
124. Karin M, Greten FR. „NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression.“ *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):749-759.
125. Kastan MB, Bartek J. „Cell-cycle checkpoints and cancer.“ *Nature.* 2004;432(7015):316-323.
126. Kausch I et al. „Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo.“ *Int J Cancer.* 2003;105(5):710-716.
127. Ke H et al. „The c-Jun NH2-terminal kinase 2 plays a dominant role in human epidermal neoplasia.“ *Cancer Res.* 2010;70(8):3080-3088.
128. Kennedy NJ et al. „Suppression of Ras-stimulated transformation by the JNK signal transduction pathway.“ *Genes Dev.* 2003;17(5):629-637.
129. Keogh MC et al. „A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery.“ *Nature.* 2006;439(7075):497-501.
130. Kersting S et al. „The impact of JNK inhibitor D-JNKI-1 in a murine model of chronic colitis induced by dextran sulfate sodium.“ *J Inflamm Res.* 2013;6:71-81.
131. Kersting S et al. „Knockout of the c-Jun N-terminal Kinase 2 aggravates the development of mild chronic dextran sulfate sodium colitis independently of expression of intestinal cytokines TNF α , TGFB1, and IL-6.“ *J Inflamm Res.* 2013;6:13-23.
132. Kim BH et al. „Usefulness of Ki-67 (MIB-1) immunostaining in the diagnosis of pulmonary sclerosing hemangiomas.“ *APMIS.* 2013;121(2):105-110.
133. Kim DH et al. „Exacerbation of collagen antibody-induced arthritis in transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6.“ *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(11):3058-3069.
134. Kim GY et al. „The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation.“ *J Biol Chem.* 2002;277(33):29792-29802.

135. Kimura Y et al. „CD44variant exon 9 plays an important role in colon cancer initiating cells.“ *Oncotarget*. 2013;4(5):785-791.
136. Kishimoto M et al. „Phosphorylation of Smad2/3 at specific linker threonine indicates slow-cycling intestinal stem-like cells before reentry to cell cycle.“ *Dig Dis Sci*. 2015;60(2):362-374.
137. Kleer CG, Appelman HD. „Ulcerative colitis: patterns of involvement in colorectal biopsies and changes with time.“ *Am J Surg Pathol*. 1998;22(8):983-989.
138. Klöppel G, Perren A, Heitz PU. „The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification.“ *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1014:13-27.
139. Komiya T et al. „p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung.“ *Clin Cancer Res*. 1997;3(10):1831-1835.
140. Krueger S et al. „Helicobacter pylori encoding the pathogenicity island activates matrix metalloproteinase 1 in gastric epithelial cells via JNK and ERK.“ *J Biol Chem*. 2006;281(5):2868-2875.
141. Kruhlak MJ et al. „Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks.“ *J Cell Biol*. 2006;172(6):823-834.
142. Kuraishy A, Karin M, Grivennikov SI. „Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation.“ *Immunity*. 2011;35(4):467-477.
143. Kusch T et al. „Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions.“ *Science*. 2004;306(5704):2084-2087.
144. Kyzer S, Gordon PH. „Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki67.“ *Dis Colon Rectum*. 1997;40(3):322-325.
145. LaBaer J et al. „New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors.“ *Genes Dev*. 1997;11(7):847-862.
146. Lai JB et al. „Inhibition of c-Jun N-terminal Kinase Signaling Pathway Alleviates Lipopolysaccharide-induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats.“ *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(14):1719-1724.
147. Lawler S et al. „Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro.“ *Curr Biol*. 1998;8(25):1387-1390.
148. Le Guellec S et al. „[Neoadjuvant treatment of breast cancer: implications for the pathologist].“ *Ann Pathol*. 2011;31(6):442-454.
149. Lee G et al. „Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis.“ *Gastroenterology*. 2010;139(3):869-81, 881.e1.
150. Lee YC et al. „High expression of phospho-H2AX predicts a poor prognosis in colorectal cancer.“ *Anticancer Res*. 2015;35(4):2447-2453.

151. Levine BJ et al. „Coupling of replication type histone mRNA levels to DNA synthesis requires the stem-loop sequence at the 3' end of the mRNA.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(17):6189-6193.
152. Li J et al. „Urotensin II inhibitor eases neuropathic pain by suppressing the JNK/NF- κ B pathway.“ *J Endocrinol*. 2017;232(2):165-174.
153. Li LT et al. „Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review).“ *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1566-1572.
154. Li N et al. „Influenza infection induces host DNA damage and dynamic DNA damage responses during tissue regeneration.“ *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(15):2973-2988.
155. Liao J et al. „Increased susceptibility of chronic ulcerative colitis-induced carcinoma development in DNA repair enzyme Ogg1 deficient mice.“ *Mol Carcinog*. 2008;47(8):638-646.
156. Lih-Brody L et al. „Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease.“ *Dig Dis Sci*. 1996;41(10):2078-2086.
157. Lipkin M. „Proliferation and differentiation of normal and neoplastic cells in the colon of man.“ *Cancer*. 1971;28(1):38-40.
158. Lipkin M, Sherlock P, Bell B. „Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. II. Cell renewal in stomach, ileum, colon, and rectum.“ *Gastroenterology*. 1963;45:721-729.
159. Liu J et al. „Effects of G250 promoter controlled conditionally replicative adenovirus expressing Ki67-siRNA on renal cancer cell.“ *Cancer Sci*. 2012;103(10):1880-1888.
160. Liu M et al. „Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937.“ *Genes Dev*. 1996;10(2):142-153.
161. Löwenberg M et al. „Specific inhibition of c-Raf activity by semapimod induces clinical remission in severe Crohn's disease.“ *J Immunol*. 2005;175(4):2293-2300.
162. Lu C et al. „Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3.“ *Mol Cell*. 2006;23(1):121-132.
163. Lu J et al. „Genetic variants in the H2AFX promoter region are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women aged \leq 55 years.“ *Breast Cancer Res Treat*. 2008;110(2):357-366.
164. Luger K et al. „Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.“ *Nature*. 1997;389(6648):251-260.
165. Lyda MH et al. „Microsatellite instability and K-ras mutations in patients with ulcerative colitis.“ *Hum Pathol*. 2000;31(6):665-671.
166. MacCallum DE, Hall PA. „The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle.“ *J Pathol*. 2000;190(5):537-544.

167. MacDonald TT. „Epithelial proliferation in response to gastrointestinal inflammation.“ *Ann N Y Acad Sci.* 1992;664:202-209.
168. Macleod KF et al. „p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage.“ *Genes Dev.* 1995;9(8):935-944.
169. Maeda H, Akaike T. „Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer.“ *Biochemistry (Mosc).* 1998;63(7):854-865.
170. Mahalingam D et al. „Differential activation of JNK1 isoforms by TRAIL receptors modulate apoptosis of colon cancer cell lines.“ *Br J Cancer.* 2009;100(9):1415-1424.
171. Mandić AD et al. „c-Jun N-terminal kinase 2 promotes enterocyte survival and goblet cell differentiation in the inflamed intestine.“ *Mucosal Immunol.* 2017
172. Manning AM, Davis RJ. „Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold.“ *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(7):554-565.
173. Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL. „H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals.“ *Nucleic Acids Res.* 1989;17(22):9113-9126.
174. Marnett LJ. „Oxyradicals and DNA damage.“ *Carcinogenesis.* 2000;21(3):361-370.
175. Marti TM et al. „H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks.“ *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(26):9891-9896.
176. Martín-Caballero J et al. „Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice.“ *Cancer Res.* 2001;61(16):6234-6238.
177. Matsuda K et al. „Ulcerative colitis with overexpression of p53 preceding overt histological abnormalities of the epithelium.“ *J Gastroenterol.* 1996;31(6):860-867.
178. Matsuda Y et al. „DNA damage sensor γ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma.“ *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:597095.
179. Matthaïos D et al. „ γ -H2AX expression detected by immunohistochemistry correlates with prognosis in early operable non-small cell lung cancer.“ *Onco Targets Ther.* 2012;5:309-314.
180. McManus KJ, Hendzel MJ. „ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells.“ *Mol Biol Cell.* 2005;16(10):5013-5025.
181. Medzhitov R. „Origin and physiological roles of inflammation.“ *Nature.* 2008;454(7203):428-435.
182. Melo J, Toczyski D. „A unified view of the DNA-damage checkpoint.“ *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(2):237-245.
183. Mendeloff AI. „The epidemiology of inflammatory bowel disease.“ *Clin Gastroenterol.* 1980;9(2):259-270.

184. Messoussi A et al. „Recent progress in the design, study, and development of c-Jun N-terminal kinase inhibitors as anticancer agents.“ *Chem Biol.* 2014;21(11):1433-1443.
185. Mirzayans R, Severin D, Murray D. „Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity.“ *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66(5):1498-1505.
186. Mitsuhashi J et al. „Significant correlation of morphological remodeling in ulcerative colitis with disease duration and between elevated p53 and p21 expression in rectal mucosa and neoplastic development.“ *Pathol Int.* 2005;55(3):113-121.
187. Mitsuyama K et al. „Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease.“ *Int J Mol Med.* 2006;17(3):449-455.
188. Mitsuyama K et al. „Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) signalling in experimentally induced gastric lesions in rats.“ *Clin Exp Immunol.* 2006;143(1):24-29.
189. Modlin IM et al. „Priorities for improving the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.“ *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(18):1282-1289.
190. Mogoantă SS et al. „Colorectal cancer - clinical and morphological aspects.“ *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55(1):103-110.
191. Mohan M et al. „Focused examination of the intestinal epithelium reveals transcriptional signatures consistent with disturbances in enterocyte maturation and differentiation during the course of SIV infection.“ *PLoS One.* 2013;8(4):e60122.
192. Moon DO et al. „Curcumin decreases binding of Shiga-like toxin-1B on human intestinal epithelial cell line HT29 stimulated with TNF-alpha and IL-1beta: suppression of p38, JNK and NF-kappaB p65 as potential targets.“ *Biol Pharm Bull.* 2006;29(7):1470-1475.
193. Morin PJ et al. „Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.“ *Science.* 1997;275(5307):1787-1790.
194. Nagao K et al. „Ki67 and BUBR1 may discriminate clinically insignificant prostate cancer in the PSA range <4 ng/ml.“ *Jpn J Clin Oncol.* 2011;41(4):555-564.
195. Nakamura TM et al. „Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast.“ *Mol Cell Biol.* 2004;24(14):6215-6230.
196. Nakano T et al. „Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer.“ *J Radiat Res.* 2010;51(1):1-8.
197. Namas R et al. „Histone H2AX phosphorylation as a measure of DNA double-strand breaks and a marker of environmental stress and disease activity in lupus.“ *Lupus Sci Med.* 2016;3(1):e000148.
198. Nasmyth K. „Viewpoint: putting the cell cycle in order.“ *Science.* 1996;274(5293):1643-1645.
199. Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A. „Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development.“ *Nature.* 2005;437(7056):281-285.

200. Niculescu AB et al. „Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.“ *Mol Cell Biol.* 1998;18(1):629-643.
201. Noffsinger AE et al. „The pattern of cell proliferation in neoplastic and nonneoplastic lesions of ulcerative colitis.“ *Cancer.* 1996;78(11):2307-2312.
202. Novik KL et al. „Genetic variation in H2AFX contributes to risk of non-Hodgkin lymphoma.“ *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(6):1098-1106.
203. Ofner D et al. „MIB1 in colorectal carcinomas: its evaluation by three different methods reveals lack of prognostic significance.“ *Anal Cell Pathol.* 1996;12(2):61-70.
204. Ogryzko VV, Wong P, Howard BH. „WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases.“ *Mol Cell Biol.* 1997;17(8):4877-4882.
205. Oka K et al. „DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma.“ *Cancer Biol Ther.* 2010;9(3):246-252.
206. Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA. „Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway.“ *Oncogene.* 2007;26(51):7222-7230.
207. Ott C et al. „The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study.“ *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20(9):917-923.
208. Panarelli NC et al. „Diagnostic Challenges Caused by Endoscopic Biopsy of Colonic Polyps: A Systematic Evaluation of Epithelial Misplacement With Review of Problematic Polyps From the Bowel Cancer Screening Program, United Kingdom.“ *Am J Surg Pathol.* 2016;40(8):1075-1083.
209. Parikh RA et al. „Loss of distal 11q is associated with DNA repair deficiency and reduced sensitivity to ionizing radiation in head and neck squamous cell carcinoma.“ *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(8):761-775.
210. Paull TT et al. „A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.“ *Curr Biol.* 2000;10(15):886-895.
211. Petit T et al. „Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy.“ *Eur J Cancer.* 2004;40(2):205-211.
212. Pilch DR et al. „Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites.“ *Biochem Cell Biol.* 2003;81(3):123-129.
213. Plaas B et al. „Protein synthesis rate measured with L-[1-11C]tyrosine positron emission tomography correlates with mitotic activity and MIB-1 antibody-detected proliferation in human soft tissue sarcomas.“ *Eur J Nucl Med.* 1999;26(4):328-332.
214. Poehlmann A et al. „Non-apoptotic function of caspases in a cellular model of hydrogen peroxide-associated colitis.“ *J Cell Mol Med.* 2013;17(7):901-913.
215. Poehlmann A et al. „Repeated H₂O₂ exposure drives cell cycle progression in an in vitro model of ulcerative colitis.“ *J Cell Mol Med.* 2013;17(12):1619-1631.

216. Poehlmann A, Roessner A. „Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers.“ *Pathology - Research and Practice*. 2010;206(9):591-601.
217. Pohl C, Hombach A, Kruis W. „Chronic inflammatory bowel disease and cancer.“ *Hepatogastroenterology*. 2000;47(31):57-70.
218. Poole AJ et al. „Tumor suppressor functions for the Cdk inhibitor p21 in the mouse colon.“ *Oncogene*. 2004;23(49):8128-8134.
219. Pox C et al. „S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0â“Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL.“ *Z Gastroenterol*. 2013;51:753-854.
220. Principi M et al. „The sharp decline of beta estrogen receptors expression in long-lasting ulcerative-associated carcinoma.“ *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(8):1002-1010.
221. Reinecke K et al. „The JNK inhibitor XG-102 protects against TNBS-induced colitis.“ *PLoS One*. 2012;7(3):e30985.
222. Reinhard C et al. „Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2.“ *EMBO J*. 1997;16(5):1080-1092.
223. Riddell RH. „Grading of dysplasia.“ *Eur J Cancer*. 1995;31A(7-8):1169-1170.
224. Riddell RH et al. „Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications.“ *Hum Pathol*. 1983;14(11):931-968.
225. Risques RA et al. „Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage.“ *Gastroenterology*. 2008;135(2):410-418.
226. Rogakou EP et al. „Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo.“ *The Journal of cell biology*. 1999;146(5):905-916.
227. Rogakou EP et al. „DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139.“ *J Biol Chem*. 1998;273(10):5858-5868.
228. Ropponen KM et al. „p22/WAF1 expression in human colorectal carcinoma: association with p53, transcription factor AP-2 and prognosis.“ *Br J Cancer*. 1999;81(1):133-140.
229. Rouse J, Jackson SP. „Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage.“ *Science*. 2002;297(5581):547-551.
230. Roy PK. „Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease.“ *WJG*. 2008;14(2):200.
231. Rutter M et al. „Endoscopic appearance of dysplasia in ulcerative colitis and the role of staining.“ *Endoscopy*. 2004;36(12):1109-1114.
232. Sabapathy K et al. „Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation.“ *Mol Cell*. 2004;15(5):713-725.

233. Sabapathy K, Wagner EF. „JNK2: a negative regulator of cellular proliferation.“ *Cell Cycle*. 2004;3(12):1520-1523.
234. Sancar A et al. „Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints.“ *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39-85.
235. Sanchez Y et al. „Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms.“ *Science*. 1999;286(5442):1166-1171.
236. Schlüter C et al. „The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.“ *J Cell Biol*. 1993;123(3):513-522.
237. Schneikert J, Behrens J. „The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development.“ *Gut*. 2007;56(3):417-425.
238. Scholzen T, Gerdes J. „The Ki-67 protein: from the known and the unknown.“ *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-322.
239. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. „Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia.“ *CA Cancer J Clin*. 2006;56(2):69-83.
240. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. „Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review).“ *Free Radic Res Commun*. 1992;17(4):221-237.
241. Schreiber M et al. „Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent.“ *Genes Dev*. 1999;13(5):607-619.
242. Schultz JK, Yaqub S, Øresland T. „Management of Diverticular Disease in Scandinavia.“ *J Clin Gastroenterol*. 2016;50 Suppl 1:S50-2.
243. Sclip A et al. „c-Jun N-terminal kinase has a key role in Alzheimer disease synaptic dysfunction in vivo.“ *Cell Death Dis*. 2014;5:e1019.
244. Sedelnikova OA, Bonner WM. „GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence.“ *Cell Cycle*. 2006;5(24):2909-2913.
245. Sedelnikova OA et al. „Quantitative detection of 125IdU-induced DNA double-strand breaks with -H2AX antibody.“ *Radiation research*. 2002;158(4):486-492.
246. Seomun Y et al. „Induction of p21Cip1-mediated G2/M arrest in H2O2-treated lens epithelial cells.“ *Mol Vis*. 2005;11:764-774.
247. Serafini EP, Kirk AP, Chambers TJ. „Rate and pattern of epithelial cell proliferation in ulcerative colitis.“ *Gut*. 1981;22(8):648-652.
248. Shaulian E, Karin M. „AP-1 as a regulator of cell life and death.“ *Nat Cell Biol*. 2002;4(5):E131-6.
249. Shchors K et al. „The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta.“ *Genes Dev*. 2006;20(18):2527-2538.

250. She QB et al. „Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.“ *Cancer Res.* 2002;62(5):1343-1348.
251. Shen Z et al. „Helicobacter saguini, a Novel Helicobacter Isolated from Cotton-Top Tamarins with Ulcerative Colitis, Has Proinflammatory Properties and Induces Typhlocolitis and Dysplasia in Gnotobiotic IL-10-/- Mice.“ *Infect Immun.* 2016;84(8):2307-2316.
252. Shibata W et al. „c-Jun NH2-terminal kinase 1 is a critical regulator for the development of gastric cancer in mice.“ *Cancer Res.* 2008;68(13):5031-5039.
253. Shiloh Y. „ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage.“ *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(1):71-77.
254. Shiloh Y. „ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.“ *Nat Rev Cancer.* 2003;3:155-168.
255. Shoji T et al. „Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer.“ *J Clin Oncol.* 2002;20(18):3865-3871.
256. Smeal T et al. „Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73.“ *Mol Cell Biol.* 1992;12(8):3507-3513.
257. Solier S et al. „Death receptor-induced activation of the Chk2- and histone H2AX-associated DNA damage response pathways.“ *Mol Cell Biol.* 2009;29(1):68-82.
258. Song Z et al. „JNK1 is required for sulindac-mediated inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in vitro and in vivo.“ *Eur J Pharmacol.* 2007;560(2-3):95-100.
259. Sorbye SW et al. „Prognostic impact of CD57, CD68, M-CSF, CSF-1R, Ki67 and TGF-beta in soft tissue sarcomas.“ *BMC Clin Pathol.* 2012;12:7.
260. Soucek L et al. „Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors.“ *Nat Med.* 2007;13(10):1211-1218.
261. Srivastava N et al. „Role of H2AX in DNA damage response and human cancers.“ *Mutat Res.* 2009;681(2-3):180-188.
262. Srivastava N et al. „Copy number alterations of the H2AFX gene in sporadic breast cancer patients.“ *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;180(2):121-128.
263. Stromar IK, Jakic-Razumovic J. „The value of immunohistochemical determination of topoisomerase II α and Ki67 as markers of cell proliferation and malignant transformation in colonic mucosa.“ *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(7):524-529.
264. Sumara G, Belwal M, Ricci R. „Jnking” atherosclerosis.“ *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(21):2487-2494.
265. Sumimoto H et al. „The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells.“ *J Exp Med.* 2006;203(7):1651-1656.

266. Tachtatzis PM et al. „Correction: Chronic Hepatitis B Virus Infection: The Relation between Hepatitis B Antigen Expression, Telomere Length, Senescence, Inflammation and Fibrosis.“ *PLoS One*. 2015;10(7):e0134315.
267. Takahashi H et al. „Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation.“ *Cancer Cell*. 2010;17(1):89-97.
268. Tanaka M et al. „Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis.“ *Scand J Gastroenterol*. 1999;34(1):55-67.
269. Tanemura S et al. „Blockage by SP600125 of Fcepsilon receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway.“ *J Biochem*. 2009;145(3):345-354.
270. Tang Y et al. „Hepatoprotective Effect of Quercetin on Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation after Intense Exercise in Mice through Phosphoinositide 3-Kinase and Nuclear Factor-Kappa B.“ *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8696587.
271. Terzić J et al. „Inflammation and colon cancer.“ *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-2114.e5.
272. Toh GW et al. „Histone H2A phosphorylation and H3 methylation are required for a novel Rad9 DSB repair function following checkpoint activation.“ *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(6):693-703.
273. Tong C et al. „c-Jun NH2-terminal kinase 1 plays a critical role in intestinal homeostasis and tumor suppression.“ *Am J Pathol*. 2007;171(1):297-303.
274. Tournier C. „The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer.“ *Genes Cancer*. 2013;4(9-10):397-400.
275. Tournier C et al. „Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway.“ *Science*. 2000;288(5467):870-874.
276. Tran CT et al. „Inflammatory signaling pathways induced by Helicobacter pylori in primary human gastric epithelial cells.“ *Innate Immun*. 2017;23(2):165-174.
277. Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. „Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies.“ *Anticancer Res*. 2009;29(7):2727-2737.
278. Ullman TA, Itzkowitz SH. „Intestinal inflammation and cancer.“ *Gastroenterology*. 2011;140(6):1807-1816.
279. van der Velden JL et al. „JNK inhibition reduces lung remodeling and pulmonary fibrotic systemic markers.“ *Clin Transl Med*. 2016;5(1):36.
280. van Schaik FD et al. „Role of immunohistochemical markers in predicting progression of dysplasia to advanced neoplasia in patients with ulcerative colitis.“ *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(3):480-488.
281. Vasilevskaya IA et al. „Inhibition of JNK Sensitizes Hypoxic Colon Cancer Cells to DNA-Damaging Agents.“ *Clin Cancer Res*. 2015;21(18):4143-4152.

282. Ventura JJ et al. „Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK.“ *Mol Cell*. 2006;21(5):701-710.
283. Ventura JJ et al. „c-Jun NH(2)-terminal kinase is essential for the regulation of AP-1 by tumor necrosis factor.“ *Mol Cell Biol*. 2003;23(8):2871-2882.
284. Vogt N, Klapper W. „Variability in morphology and cell proliferation in sequential biopsies of mantle cell lymphoma at diagnosis and relapse: clinical correlation and insights into disease progression.“ *Histopathology*. 2013;62(2):334-342.
285. Vogt PK. „Fortuitous convergences: the beginnings of JUN.“ *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):465-469.
286. von Herbay A, German SODAMD. „[Guidelines of the DGVS. Histopathological diagnosis. German Society of Digestive and Metabolic Diseases].“ *Z Gastroenterol*. 2001;39(1):25-27.
287. Waetzig GH, Schreiber S. „Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases.“ *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18(1):17-32.
288. Waetzig GH et al. „p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease.“ *J Immunol*. 2002;168(10):5342-5351.
289. Waga S et al. „The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.“ *Nature*. 1994;369(6481):574-578.
290. Wagner EF, Nebreda AR. „Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development.“ *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):537-549.
291. Wang CH et al. „Transcriptional repression of p21((Waf1/Cip1/Sdi1)) gene by c-jun through Sp1 site.“ *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270(1):303-310.
292. Wang H, Stjernholm YV. „Plasma membrane receptor mediated MAPK signaling pathways are activated in human uterine cervix at parturition.“ *Reprod Biol Endocrinol*. 2007;5:3.
293. Wang J et al. „A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss.“ *J Neurosci*. 2003;23(24):8596-8607.
294. Wang S et al. „CUEDC2 Protects Against Experimental Colitis and Suppresses Excessive Proliferation of Intestinal Mucosa.“ *Dig Dis Sci*. 2015;60(12):3603-3609.
295. Wang Y et al. „Taurine zinc solid dispersions enhance bile-incubated L02 cell viability and improve liver function by inhibiting ERK2 and JNK phosphorylation during cholestasis.“ *Toxicology*. 2016;366-367:10-19.
296. Warfel NA, El-Deiry WS. „p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after.“ *Curr Opin Oncol*. 2013;25(1):52-58.
297. Westbrook AM et al. „Intestinal inflammation induces genotoxicity to extraintestinal tissues and cell types in mice.“ *Int J Cancer*. 2011;129(8):1815-1825.
298. Weston CR, Davis RJ. „The JNK signal transduction pathway.“ *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):142-149.

299. Wink DA et al. „The multifaceted roles of nitric oxide in cancer.“ *Carcinogenesis*. 1998;19(5):711-721.
300. Wittekind C. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. John Wiley & Sons; 2010
301. Wong NA et al. „Cyclin D1 and p21 in ulcerative colitis-related inflammation and epithelial neoplasia: a study of aberrant expression and underlying mechanisms.“ *Hum Pathol*. 2003;34(6):580-588.
302. Wong NA et al. „Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assists the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia.“ *Histopathology*. 2000;37(2):108-114.
303. Woods D et al. „Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1.“ *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):5598-5611.
304. Wu GS. „Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer.“ *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):579-585.
305. Xie A et al. „Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair.“ *Mol Cell*. 2007;28(6):1045-1057.
306. Xie CM et al. „Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation.“ *Free Radic Biol Med*. 2011;51(7):1365-1375.
307. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. „BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M.“ *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):8469-8478.
308. Yamanishi Y et al. „Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):10025-10030.
309. Yao K et al. „Licochalcone A, a natural inhibitor of c-Jun N-terminal kinase 1.“ *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014;7(1):139-149.
310. Yasuda J et al. „The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins.“ *Mol Cell Biol*. 1999;19(10):7245-7254.
311. Yasui W et al. „Expression of p21WAF1/CIP1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p53 protein expression.“ *Pathol Int*. 1997;47(7):470-477.
312. Yerushalmi R et al. „Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential.“ *Lancet Oncol*. 2010;11(2):174-183.
313. Zeng H et al. „Colonic inflammation accompanies an increase of β -catenin signaling and Lachnospiraceae/Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice.“ *J Nutr Biochem*. 2016;35:30-36.
314. Zhang B. „[Neoadjuvant endocrine therapy for postmenopausal estrogen receptor-positive patients with breast cancer].“ *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2011;33(4):241-244.
315. Zhang H, Hannon GJ, Beach D. „p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states.“ *Genes Dev*. 1994;8(15):1750-1758.

316. Zhao J et al. „The c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway is activated in human interstitial cystitis (IC) and rat protamine sulfate induced cystitis.“ *Sci Rep.* 2016;6:19670.
317. Zhou BB, Elledge SJ. „The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.“ *Nature.* 2000;408(6811):433-439.
318. Zhu MM et al. „Increased JNK1 signaling pathway is responsible for ABCG2-mediated multidrug resistance in human colon cancer.“ *PLoS One.* 2012;7(8):e41763.

Anhang

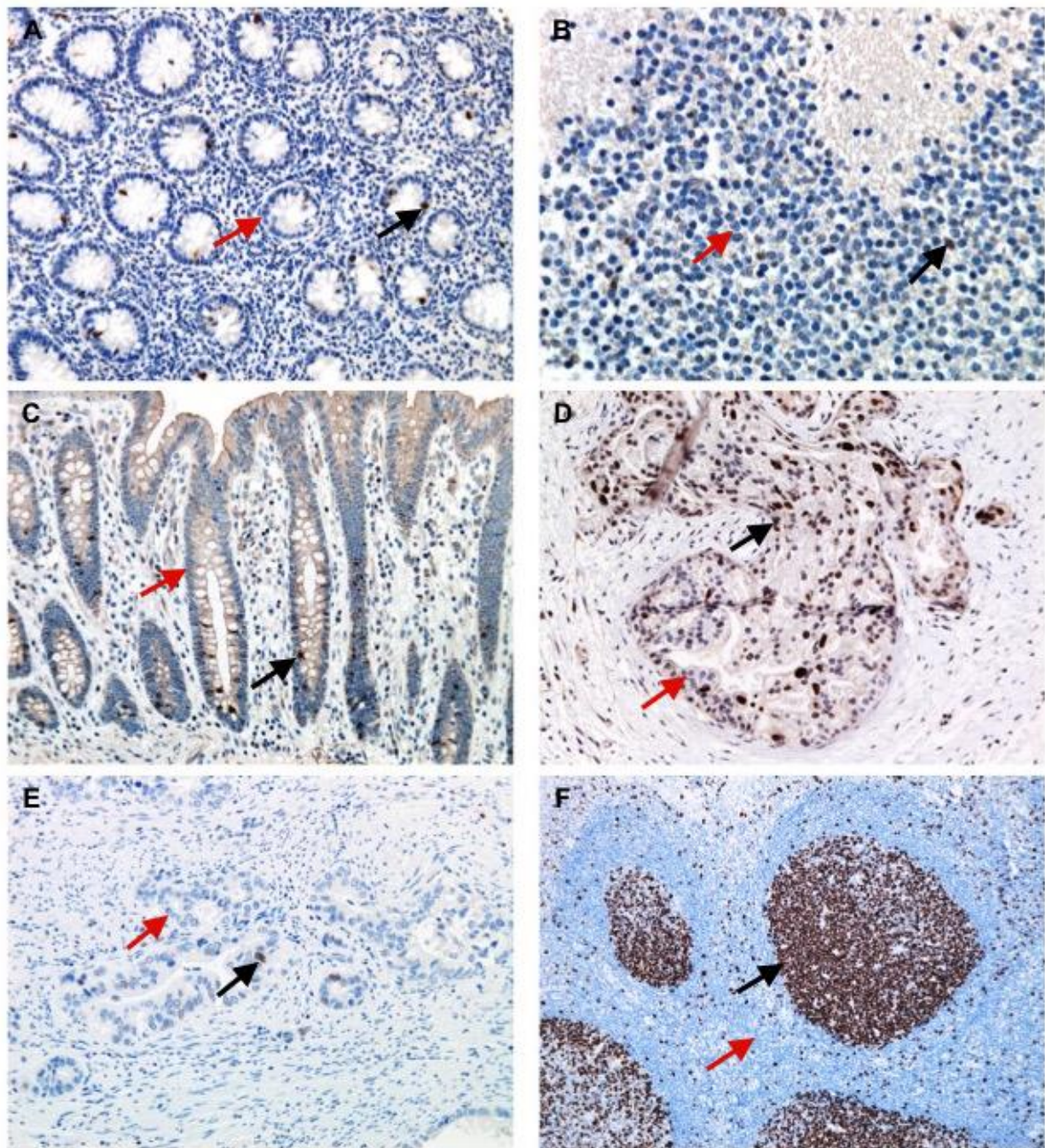


Abb. 28: Positiv- und Negativkontrollen der verwendeten Antikörper. Entzündungs- und tumorfreie Kolonschleimhaut (A) und fetales Hirngewebe (B) als Positiv- (⇒) und Negativ- (⇨) Kontrollen für den p-JNK123-Antikörper (x200). (C) Entzündungs- und tumorfreie Kolonschleimhaut als Positiv- (⇒) und Negativ- (⇨) Kontrolle für den p-JNK2-Antikörper (x200). (D) Peritonealmetastase eines high-grade serösen Ovarialkarzinoms als Positiv- (⇒) und Negativ- (⇨) Kontrolle für den γ -H2AX-Antikörper (x200). (E) Mäßig differenziertes Adenokarzinom des Magens, vom intestinalen Typ nach Laurén als Positiv- (⇒) und Negativ- (⇨) Kontrolle für den p21^{WAF1}-Antikörper (x200). (F) Regelmäßiges Tonsillenparenchym als Positiv- (⇒) und Negativ- (⇨) Kontrolle für den Mib1-Antikörper (x100).

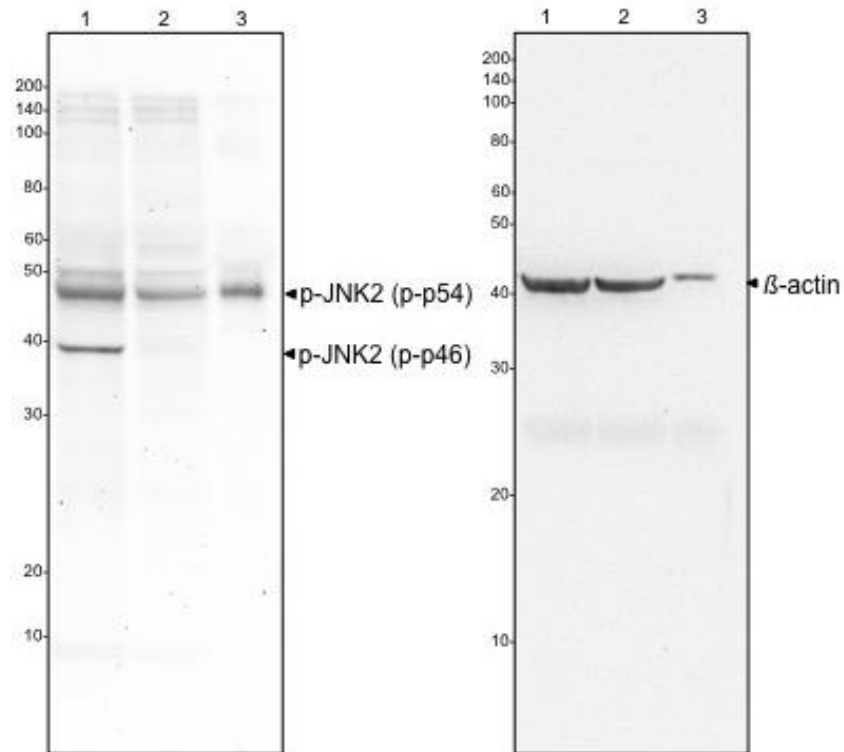


Abb. 29: Immuno-Blot Analysen zur Bestimmung der Spezifität des p-JNK2-Antiköpers. Immuno-Blot Analysen von entzündungs- und tumorfreier Kolonschleimhaut (1, 2) und entzündungs- und tumorfreiem Mammaparenchym (3). Die Lysate wurden mittels Immunoblotting unter Verwendung des p-JNK2- und des β -Actin-Antiköpers analysiert. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Angela Pöhlmann-Nitsche für die Bereitstellung dieses spannenden und schönen Themas und der damit verbundenen Betreuung bedanken. Ihre Begeisterung für das Thema, ihre Neugier und ihr immenser Wissensschatz haben nicht nur den Grundstein für diese Arbeit gelegt sondern waren mir auch Ansporn und Motivation. Bei Fragen und aufkommenden Problemen war sie stets erreichbar und engagiert, ihre Erfahrung und Ratschläge waren ein ständiger Rückhalt.

Insbesondere danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Albert Roessner, der mir zum einen die Möglichkeit gab diese Dissertation in dem unter seiner Leitung stehenden Institut verfassen zu dürfen und mich zum anderen in histologischen und immunhistologischen Fachfragen unterstützt hat.

Mein ausdrücklicher Dank gebührt darüber hinaus Frau OÄ Prof. Dr. med. Dörthe Jechorek aus dem Institut für Pathologie für ihr uneigennütziges Engagement, die tatkräftige Unterstützung und die hervorragenden Ideen.

Herrn Dr. rer. nat. Friedrich-Wilhelm Röhl aus dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg möchte ich herzlich für die, zum Teil kurzfristige und stets geduldige Beratung bei der statistischen Auswertung danken.

Ich möchte all meinen Arbeitskollegen danken, die mich moralisch unterstütz haben und mir zeitliche Freiräume ermöglichten, ohne die die Vollendung dieser Arbeit in weite Ferne gerückt wäre.

Frau Kügler, Frau Miethke und Frau Wiest aus dem immunhistologischen Labor des Institutes für Pathologie möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Etablierung der verwendeten Antikörper und für die Durchführung der immunhistologischen Färbungen danken. Frau Antje Schinlauer aus dem Forschungslabor des Institutes für Pathologie danke ich für die Erstellung des Western Blots.

Von ganzem Herzen möchte ich an dieser Stelle meinem Freund und meiner Familie danken. Ohne ihre stete Unterstützung, ihr Verständnis und Vertrauen in mich, wäre für mich sicherlich vieles unerreichbar geblieben.

Liste der Veröffentlichungen und anderer wissenschaftlicher Leistungen

- **Lessel W**, Silver A, Jechorek D, Guenther T, Roehl FW, Kalinski T, Roessner A, Poehlmann-Nitsche A (2017):
Inactivation of JNK2 as carcinogenic factor in colitis-associated and sporadic colorectal carcinogenesis. Carcinogenesis; CARCIN-2016-00322.R1
Angenommen, März 2017.
- Poehlmann A, Reissig K #, Just A #, Walluscheck D, Hartig R, Schinlauer A, **Lessel W**, Guenther T, Silver A, Steinberg P & Roessner A (2013) (#: equally distributed):
Non-apoptotic function of caspases in a cellular model of hydrogen peroxide-associated colitis.
J Cell Mol Med. 2013 Jul;17(7):901-13. doi: 10.1111/jcmm.12079.
- Poehlmann A, Reissig K, Schönfeld P, Walluscheck D, Schinlauer A, Hartig R, **Lessel W**, Guenther T, Silver A, Roessner A (2013):
Repeated H₂ O₂ exposure drives cell cycle progression in an in vitro model of ulcerative colitis.
J Cell Mol Med. 2013 Dec;17(12):1619-31. doi: 10.1111/jcmm.12150.
- Jannasch O, Petersen M, **Lessel W**, Bruns C, Meyer F (2017):
A rare case of perforated "sub-hepatic appendicitis" - a challenging differential diagnosis of acute abdomen based on the combination of appendicitis and maldescent of the caecum.
Pathol Res Pract. 2017 Jan;213(1):75-78. doi: 10.1016/j.prp.2016.11.006. Epub 2016 Nov 21.
- **Lessel W**, Silver A, Jechorek D, Guenther T, Roehl FW, Roessner A, Poehlmann-Nitsche A (2017):
Inactivation of JNK2 as carcinogenic factor in colitis-associated and sporadic colorectal carcinogenesis (A-471)
Posterpräsentation bei der 101. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Erlangen, Juni 2017. Angenommen März 2017.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle des JNK-Signalwegs in der Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinogenese“

im Institut für Pathologie mit Unterstützung durch Frau PD Dr. rer. nat. Angela Pöhlmann-Nitsche, Frau Prof. Dr. med. Dörthe Jechorek und Herrn Dr. rer. nat. Friedrich-Wilhelm Röhl (Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg)

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 06.04.2017

.....

Wiebke Lessel

Lebenslauf

AUSBILDUNG

10/2005-10/2011 Studium der Humanmedizin
(Otto-von-Guericke Universität Magdeburg)
11/2011 Approbation, ÄK Sachsen-Anhalt

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 02/12 Facharztweiterbildung Pathologie im Institut für Pathologie,
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

PROMOTION

Seit 08/12 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Thema: „Die Rolle des JNK-Signalwegs in der Colitis ulcerosa-
assoziierten Karzinogenese“.