

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**REGULATION VON FAKTOREN DER  
ANGIOGENESE DURCH DIE  
KURZKETTIGE FETTSÄURE BUTYRAT**

Inaugural – Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Gwendolin Etzrodt-Walter

aus Senden

Würzburg, Mai 2005

Referent: Prof. Dr. med. W. Scheppach

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2005

Die Promovendin ist Ärztin

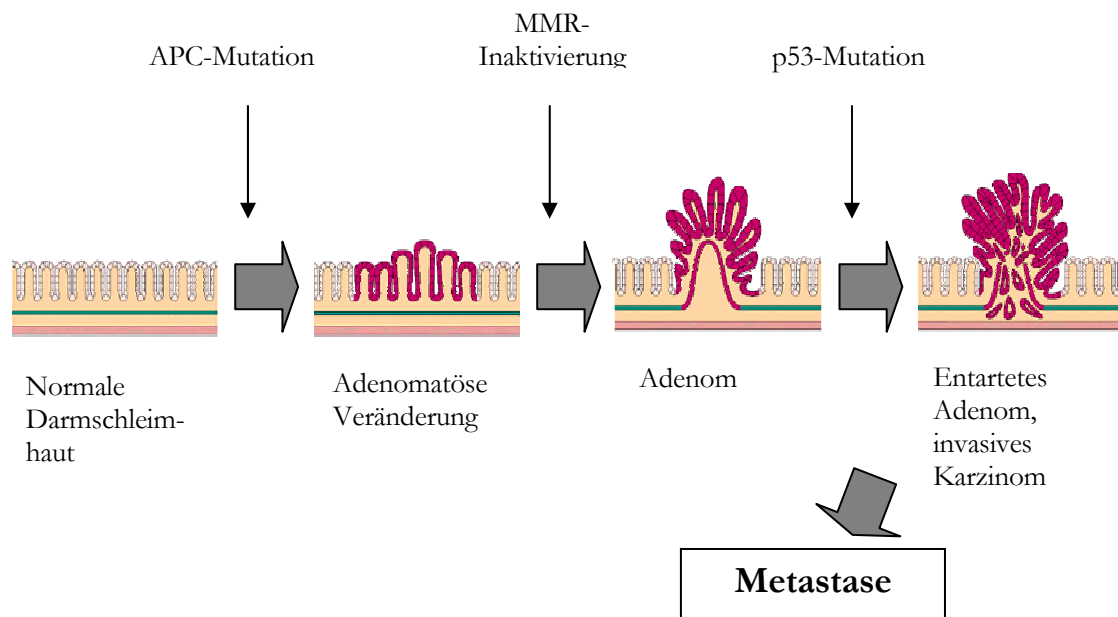
## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	Kurzkettige Fettsäuren (SCFA)	4
1.3	Angiogenese und Tumorprogression	6
1.4	Fragestellung	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Zellkultur	11
2.1.1	Materialien und Geräte.....	11
2.1.2	Zelllinien .....	12
2.1.3	Kultivierung .....	13
2.2	RNase Protection Assay	14
2.2.1	Materialien und Geräte.....	14
2.2.2	RNA Isolation .....	17
2.2.3	Sondenherstellung.....	18
2.2.4	RNase Protection Assay (RPA).....	19
2.3	Western Blot	21
2.3.1	Materialien und Geräte.....	21
2.3.2	SDS-Page, Blotting und Färbung.....	23
2.4	ELISA	25
2.4.1	Materialien und Geräte.....	25
2.4.2	Assay.....	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Einfluss von Butyrat auf die mRNA-Expression von Angiogenesefaktoren und deren Rezeptoren	27
3.1.1	HT29 .....	27
3.1.2	CX1.....	28
3.1.3	SW480 .....	30
3.1.4	SW620 .....	31
3.1.5	Zusammenfassung.....	33
3.2	Modulation der Proteinexpression von VEGF unter dem Einfluß von Butyrat bei den Zelllinien HT29 und HCT15	35
3.2.1	ELISA .....	35
4	Diskussion	39
4.1	Die Wirkung von Butyrat auf VEGF und FLT-1	39
4.2	Die Wirkung von Butyrat auf p53	41
4.3	Die Verknüpfung zwischen VEGF/FLT-1 und p53	44
4.4	Ausblick	46
5	Zusammenfassung	48
6	Anhang	49
6.1	Abbildungsverzeichnis	49
6.2	Tabellenverzeichnis	50
6.3	Abkürzungsverzeichnis	50
7	Literaturverzeichnis	54

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Im Rahmen von Malignomerkrankungen stellt das kolorektale Karzinom hinter dem Lungenkarzinom die häufigste Krebserkrankung beider Geschlechter weltweit dar (IARC Cancer Base, 2000). Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens einen gutartigen kolorektalen Tumor - adenomatöser Polyp zu entwickeln, liegt bei 50%. Bei diesen Polypen kommt es mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 10% zu einer malignen Transformation (Kinzler, 1996). Die Tumorerkrankung im Kolon ist ein komplexer Prozess, der sich über die Hyperproliferation des Kolongewebes, aberrante Krypten, Dysplasien, Adenome, pre-invasive und invasive Karzinome bis zur Metastasenbildung erstreckt. Die dabei zu beobachtenden genetischen Alterationen werden als Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms bezeichnet (Kinzler, 1996). Der zeitliche Rahmen für diese Entwicklung beträgt 10-20 Jahre. Gekennzeichnet ist dieser Prozess unter anderem durch den Verlust an Tumorsuppressor-Genen und der Bildung oder Aktivierung intrazellulärer Onkogene (Vogelstein, 1988). Die wichtigsten Tumorsuppressor-Gene in diesem Zusammenhang stellen das APC- sowie das p53-Gen dar. Unter den Protoonkogenen spielen das K-Ras, c-myc und das bcl-2 Gen eine entscheidende Rolle. Das weitere Fortschreiten des Tumorwachstums wird durch den Ausfall des DNA-Mismatch-Reparatursystems (MMR) begünstigt (vgl. Abb. 1).



**Abb.1:** Adenom-Karzinom-Sequenz mit zeitlichem Zusammenhang verschiedener Mutationen bzw. Veränderungen.

Das APC-Gen befindet sich auf 5q21 und stellt ein sogenanntes Wächtergen dar (Bodmer, 1987). Eine Störung dieser Funktionsregion führt zu einer verminderten Zelladhäsion mit konsekutiv erhöhtem Entartungsrisiko (vgl. Abb.1). Liegt eine Keimbahnmutation des APC-Gens vor, führt dies zur familiären adenomatösen Polyposis (FAP), einer Erkrankung in deren Verlauf sich bei allen betroffenen Patienten mit einem Lebenszeit-Risiko von 100% kolorektale Karzinome entwickeln (Fearhead 2002).

Als weitere Form erblicher Kolonkarzinome ist das hereditäre non-Polyposis kolorektale Karzinom (HNPCC) zu nennen. Diese Form ist eine der anspruchsvollsten, da das Management der betroffenen Familien zusätzliche Faktoren umfasst. In den Amsterdam-Kriterien wurden die Diagnose und Vorsorge-Kriterien niedergelegt (Abb. 2).

<b>Amsterdam-Kriterien</b>
alle Kriterien müssen erfüllt sein
<ul style="list-style-type: none"><li>• mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom oder Endometrium-, Dünndarm-, Nierenbecken-, Ureter-Karzinom</li><li>• einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen</li><li>• Erkrankungen in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen</li><li>• mindestens ein Patient mit der Diagnose des kolorektalen Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr</li><li>• Ausschluss einer Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP)</li></ul>

**Abb. 2: Amsterdam-Kriterien für die hereditäre Form des Non-Polyposis-Kolorektalen Karzinoms (HNPCC) (Zusammenfassung der Amsterdam I und Amsterdam II Kriterien)**

Die Penetranz der Mutation liegt bei 80% und es besteht eine erhöhte Prädisposition, andere Adenokarzinome zu entwickeln, vor allem Endometrium-, Blasen- und Dünndarm-Karzinome (Lynch, 1993). Hierbei führt die Inaktivierung des DNA-Mismatch-Reparatursystem (MMR) zur Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (Salhshor, 1999). Eine solche Inaktivierung liegt in 20-25% dieser HNPCC-Fälle vor. Eine verstärkte Mutationsanfälligkeit, ist insbesondere an Abschnitten mit repetitiven, nicht kodierenden Sequenzen die Folge. Bestimmte dieser Mikrosatellit-Sequenzen kodieren für Regulationsgene des Zellwachstums. Einige dieser Mutationen führen wiederum zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressor-Genen. Insgesamt kommt es durch die Veränderungen des MMR-Systems zu einer Anhäufung von Mutationen. Dies führt zu einer Änderung des Zellverhaltens und ist demzufolge mit dem Verlust des normalen Zellwachstums verbunden (Atkin, 2001).

Insgesamt machen die hereditären Kolonkarzinome einen Anteil von bis zu 20% aller Kolonkarzinome aus. Dabei entwickelt sich der überwiegende der kolorektalen Karzinome auf der Grundlage somatischer Mutationen (Potter JD, 1999; Giardiello, 2001). 80-85% der an einem kolorektalen Karzinom Erkrankten weisen eine chromosomale Instabilität auf (Redston, 2001).

Betrachtet man die Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms, so findet sich eine überwältigende Evidenz für den starken Einfluss von Umweltfaktoren (überwiegend Ernährungsfaktoren). Daher wird ein pathophysiologisches Modell diskutiert, welches endogene (genetische) und exogene (nutritive) Aspekte miteinander verbindet (Scheppach, 2000). Die Adenom-Karzinom-Sequenz ist demzufolge genetisch determiniert, die

Progression innerhalb der Sequenz jedoch wahrscheinlich durch Ernährungsfaktoren moduliert (im Sinne der Protektion bzw. Akzeleration).

## 1.2 Kurzkettige Fettsäuren (SCFA)

Darmbakterien produzieren durch Fermentation von Ballaststoffen vor allem Butyrat, Acetat und Propionat (Kritchevsky, 1995). Butyrat ist die Hauptenergiequelle für Kolozyten (Scheppach, 1994). Durch den Krebs-Zyklus und durch  $\beta$ -Lipolyse kommt es zur Energiegewinnung aus Fettsäuren. Experimente an Zellkulturen kolorektaler Karzinome zeigten, dass sich durch Butyrat sowohl Zellwachstum inhibieren, als auch Differenzierungsmarker induzieren lassen (Kruh, 1982). Diese anscheinend widersprüchliche Effekte werden gemeinhin als „Butyrat-Paradoxon“ bezeichnet (Gibson, 1999; vgl. Tab. 1). Die Wirkung von Butyrat wird überwiegend auf die nicht-kompetitive Hemmung der Histondeazetylierung (HDAC) zurückgeführt (Boffa, 1992).

	physiologische Darmschleimhaut		neoplastisches Gewebe	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo
Apoptose	reduziert	reduziert	erhöht	unbekannt
Proliferation	beschleunigt	beschleunigt	reduziert	reduziert ?
Differenzierung	supprimiert	unverändert	induziert	unbekannt

**Tab. 1: Das Butyrat-Paradoxon (nach Gibson et al. 1999).** Dargestellt wurden die Effekte von Butyrat auf physiologische und dysplastisch veränderte Kolonozyten. Die mit „?“ markierte Angabe ist bislang nur vermutet, jedoch nicht bestätigt.

Der Histon-Deazetylase-Hemmstoff (R-)Trichostatin A (TSA) ist ein Streptomyces-Produkt. 1990 wurde beschrieben, dass TSA nicht nur zu einer Hyperazetylierung führt, sondern ebenfalls differenzierend und hemmend auf die Proliferation wirkt (Yoshida, 1990). TSA führt über den Weg der Hyperazetylierung zu einer Aktivierung bestimmter Gene (Arts, 1995). TSA hat somit auf Butyrat vergleichbare Effekte bezüglich Proliferation und Differenzierung. Somit dient es als Kontrollsubstanz bezüglich der HDAC-Inhibition vermittelten Wirkung.

Unter physiologischen Bedingungen werden täglich 300 mmol kurzkettige Fettsäuren produziert. Im Darmlumen werden insgesamt Konzentrationen von 100 mmol erreicht, welche sich in Butyrat, Propionat und Azetat aufgliedern. Diese sind in absteigenden Konzentrationen von Coecum (131 mmol/kg) bis Colon descendens (80 mmol/kg) nachweisbar (Cummings, 1987; Clausen, 1995). Die Butyrat-Konzentration im Stuhl beträgt ca. 18 mmol/kg und im Portalvenen-Blut liegt die Konzentration im Mittel bei 3 mmol/l (Kashtan, 1992; Scheppach, 1988). Zellkulturversuche werden mit Konzentrationen von 1-10 mmol Butyrat durchgeführt. In vitro wird das Zellwachstum bei Konzentrationen von 10 mmol gestoppt. In vivo wachsen Kolonkarzinomzellen auch bei höheren Konzentrationen weiter. Verglichen mit anderen Zellen kann sowohl bei gesunden als auch bei entarteten Kolon-Zellen kein Unterschied in der Verwertung von Butyrat gesehen werden. Ausschlaggebend ist die Zellart. Kolonzellen haben eine höhere Affinität zu Butyrat, wohingegen Neurone eine Präferenz für Glucose haben. Man nimmt an, dass es bei geringeren Konzentrationen zu trophischen Veränderungen der transformierten Zellen kommt und bei höheren Konzentrationen die wachstumsinhibierende Komponente zum Tragen kommt (Scheppach, 1994).

Der Zusammenhang zwischen ballaststoffreicher Ernährung und der geringeren Inzidenz kolorektaler Karzinome wird seit längerem beobachtet. Ursächlich hierfür werden eine Verringerung der Mutagene durch eine kürzere Verweildauer, eine erhöhte Stuhlmasse, eine kürzere Kontaktzeit von Gallensäuren, einen erniedrigten pH und eine gesteigerte Produktion kurzkettiger Fettsäuren diskutiert (Hill, 1995). Viele in vitro Experimente haben gezeigt, dass Butyrat bereits unterhalb der physiologischen Konzentrationen als Wachstumsinhibitor und als Induktor von Differenzierungsmarkern agiert (Bernard, 1993). In untransformierten Zellen führt Butyrat zur Induktion von Apoptose (Tsuji, 1995). Tsuji und Du Bois konnten zeigen, dass Butyrat sowohl in vitro als auch in vivo zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt (Tsuji, 1995). Der Weg, über den Butyrat Apoptose induziert, ist p53 unabhängig. Eine Mutation im p53 Tumorsuppressor-Gen ist hingegen eine der häufigsten Mutationen, welche in Tumoren gefunden wird (Levine, 1991).



### 1.3 Angiogenese und Tumorprogression

Der Begriff Angiogenese beschreibt nicht nur die Neubildung von Gefäßen (Neovaskularisation), sondern impliziert auch die Reaktion des gesamten umgebenden Gewebes. Dies ist ein komplexer Prozess, welcher auch als „Stroma-Reaktion“ bezeichnet wird (Etoh, 2000).

Die lokale Tumorentwicklung ist primär unabhängig von Blutgefäßen. Eine Versorgung wird über Diffusion sichergestellt. Ab einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> werden bei soliden Tumoren Blutgefäße benötigt. Entfällt eine solche Versorgung, nekrotisiert das Tumorzentrum und ausschließlich die peripheren Anteile proliferieren (Robbins 1999, Hanahan 1996). Demnach ist die Sicherstellung einer adäquaten Vaskularisierung von entscheidender Bedeutung. Eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielen die proangiogenetischen Faktoren, wie beispielsweise der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Maio, 2001). Das Tumorstadium lässt sich in zwei Phasen einteilen - eine prävasculäre und eine vaskuläre Phase.

In der prävasculären Phase, auch „angiogenetic switch“ genannt, kommt es zu einem nur sehr langsamen und limitierten Wachstum des Primärtumors (Hanahan, 1996). Der Tumor behält durch das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation eine gewisse Größe (Holmgren, 1995). In diesem Tumorstadium wird nur eine sehr geringe Anzahl an Tumoren diagnostiziert. Durch Hypoxie oder Kompression des Tumorzentrums sezernieren maligne transformierte Zellen VEGF (Mukhopadhyay, 1995), welches das Wachstum der Gefäße positiv beeinflusst und somit zu einer Tumorprogression führt (Leung, 1989).

Die vaskuläre Phase ist gekennzeichnet durch einen geregelten Stoffwechsel des Tumorgewebes und führt somit zu einem raschen Wachstum des Tumors. Zu den Voraussetzungen der Neovaskularisation gehört die Expression bestimmter Wachstumsfaktoren. Unter anderen gehören dazu der basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF), der Platelet derived Growth Factor (PDGF) und die Interleukine IL-1, -6 und -8 (Sunderkotter, 1994). Sowohl die Endothelzellen als auch die Tumorzellen selbst, werden durch diese Wachstumsfaktoren autokrin und parakrin stimuliert. In der Arbeit von Zgouras wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  - welcher in der Hypoxie-vermittelten Angiogenese eine wichtige Rolle spielt - durch Butyrat eine verminderte Expression zeigte (Zgouras, 2002).

Einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF, VEGF-A). VEGF ist ein Heparin-gebundenes Glykoprotein, welches sezerniert wird und ein Molekulargewicht von ungefähr 45kD besitzt (Leung 1989, Ferrara 1995). Während des Slicing-Prozesses entstehen 5 Produkte mit unterschiedlichen, namensgebenden Aminosäurenlängen, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, und VEGF<sub>206</sub>. (Houck 1991, Ferrara 1991). Alle Isoformen führen zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und haben ähnliche Effekte auf Migration und Wachstum (Houck 1991). Sie unterscheiden sich in Sekretionsausmaß und in der Heparin-Bindungsfähigkeit. Die kurzkettigen VEGF-Isoformen sind die häufigsten, da die länger-kettigen Derivate an Heparinsulfate der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix gebunden sind (Houck 1992). VEGF ist neben VEGF-B, -C, -D, -E und dem placenta growth factor (PGF oder PlGF) Mitglied der VEGF-Familie (Tab.2). Unter physiologischen Bedingungen wird VEGF im Rahmen hypoxischer Situationen in Geweben produziert, exprimiert und sezerniert. Dies geschieht zum Beispiel im Zusammenhang des Endometriumaufbaus nach der Menstruationsphase (McLaren, 2000).

<b>Faktor</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Rezeptor</b>
<b>VEGF (-A)</b>	Gefäßendothel (u.a. Magen, Colon)	FLT-1 (VEGFR1); KDR (VEGFR2)
<b>VEGF-B</b>	Herz und Skelettmuskulatur	FLT-1 (VEGFR1)
<b>VEGF-C</b>	Endothel der Lymphgefäße	KDR (VEGFR2); FLT-4 (VEGFR3)
<b>VEGF-D</b>	GIT, Lunge Herz und Skelettmuskulatur	KDR (VEGFR2); FLT-4 (VEGFR3)
<b>VEGF-E</b>	Orf-Virus Genom	KDR (VEGFR2)
<b>PGF (PlGF)</b>	Plazenta	FLT-1 (VEGFR1)

**Tab.2:** Die VEGF-Familie und die zugehörigen Rezeptoren

VEGF bewirkt eine 50000-fach höhere Permeabilität als Histamin (Senger, 1986), deshalb wird VEGF auch vascular endothelial permeability Factor (VEPF, VPF) genannt. Roberts et

al. zeigten, dass in unfenestrierten Gefäßen die Applikation von VEGF zu einer erhöhten Permeabilität durch Fenestrierung der Gefäße führte (Roberts, 1995).

Als Rezeptoren für VEGF wurden zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren beschrieben, welche mit hoher Affinität VEGF binden: KDR (Kinase insert Domain-containing Rezeptor) und FLT-1 (fms-like tyrosine kinase-1) (Ferrara, 1997). Beide werden hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert. Die Bindung von VEGF an den Rezeptor führt zur Bildung eines Dimers und zur Aktivierung der intrinsischen Kinase. Dies wird gefolgt von einer Autophosphorylierung des Rezeptors mit anschließender Signaltransduktion. Ähnliches gilt für die restlichen Faktoren der VEGF-Familie. Hierbei sind jedoch auch zusätzliche Rezeptoren beschrieben. Zum Beispiel für VEGF-C/-D existiert ein weitere Rezeptor FLT-4, beziehungsweise VEGFR-3 (Tab. 2).

Zwischen der Durchblutung des Primärtumors und der Metastasierungstendenz des Tumors bestehen enge Zusammenhänge. Innerhalb des Tumorgewebes sind die VEGF-Rezeptoren meist überexprimiert (Quinn, 1993; Terman, 1991). Die im Tumor entstehenden sogenannten pathologischen Blutgefäße weisen zusätzlich eine höhere Permeabilität als die physiologischen Blutgefäße des Gastrointestinaltraktes auf. Hierbei kommt es zu einem verstärkten Austritt von Plasmaproteinen, welche den Nährboden für neues Tumorwachstum bilden (Dvorak, 1986).

Neovaskularisation ist für das Wachstum und die Ausdehnung sowohl des Primärtumors, als auch der Metastasen, absolut notwendig. Sie stellt jedoch gleichzeitig eine kritische Phase dar (Folkman, 1995). Maligne Zellen sind in der Lage, inaktive Endothelzellen durch eine Überexpression von proangiogenetischen Faktoren wie VEGF und bFGF zu aktivieren (Josko, 2000; Poole, 2001). Sie sind aber auch in der Lage, die Expression antiangiogenetischer Faktoren wie Angiostatin zu hemmen (Cao, 1996). Um eine Absiedlung der Tumorzellen zu gewährleisten, ist die Präsenz von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und ICAM-1 unabdingbar. Diese gewährleisten einen Übertritt. VEGF trägt auch hierbei entscheidend dazu bei, da VEGF die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 fördert (Melder, 1996).

Neoplastisch veränderte Zellen weisen meist Mutationen auf. Insbesondere Mutationen im p53-Gen stellt ein häufiges Phänomen bei kolorektalen Karzinomen dar. Kieser et al. haben gezeigt, dass es hiermit zu einer Steigerung der VEGF-Expression kommt (Kieser, 1994). Diese Überexpression von VEGF zeigt sich hingegen nicht in Zellen mit wild-typ p53 (Zhang, 2000). Diese tumorbedingte VEGF-Überexpression ist konsekutiv mit einer

verstärkten Gefäßneubildung verbunden. Die Menge der ausgebildeten Blutgefäße korreliert mit der VEGF-Expression (Takahashi, 1997).

Während der Adenom-Karzinom-Sequenz weist bereits das Adenom eine größere Dichte an Blutgefäßen als normale Darmschleimhaut auf. Diese Dichte nimmt während der weiteren Transformation zum Karzinom noch weiter zu (Bossi, 1995). Zwischen Adenom und Dysplasie besteht ein Unterschied in der Gefäßverteilung. Hingegen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von VEGF zwischen stark dysplastischem und invasiv wachsendem Gewebe festgestellt werden (Wong, 1999).

Es gibt weitere Mediatoren, diese sind zum Beispiel Protease activated Receptor (PAR), Fibroblastic Growth Faktor (FGF) und der bereits erwähnte basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF). Fibroblastic Growth Faktor 10 (FGF10) ist zum Beispiel ein Wachstumsfaktor welcher die Wundheilung aktiviert. Dieser Faktor wird sezerniert und ist ebenfalls ein Mitglied der an Heparin bindenden Wachstums Faktoren (Cancilla, 1999).

## 1.4 Fragestellung

Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine Vielzahl an pro- und antiangiogenetischen Faktoren bekannt. Eine kritische Analyse epidemiologischer und interventioneller Studien zeigen, dass eine direkt umgekehrte Beziehung zwischen der Zufuhr von Ballaststoffen und dem Entstehen von kolorektalen Karzinomen existiert (Kim, 2000). Die Fermentation von Ballaststoffen innerhalb des Kolons durch Darmbakterien führt zur Bildung kurzkettiger Fettsäuren wie Butyrat, Acetat und Propionat (Kritchevsky, 1995). Unter den kurzkettigen Fettsäuren scheint Butyrat die stärkste protektive Wirkung zu haben (Wargovich, 1996). In vitro hat Butyrat Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung, Beweglichkeit, Adhäsion und Apoptose gezeigt (Emenaker, 2001). Zusätzlich werden Gene der Regulation des Zellzyklus, die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB (Lührs, 2001), die Hyperacetylierung der Histone (Boffa, 1992) und Nicht-Histon-Proteine (Lührs, 2002) durch Butyrat moduliert. Diese Effekte sind höchstwahrscheinlich die zugrunde liegenden Mechanismen des protektiven Effektes der kurzkettigen Fettsäure Butyrat im Rahmen der Kolon-Karzinogenese. Pili et al. haben 2001 einen inhibitorischen Effekt von Phenylbutyrat auf die Angiogenese in Heterotransplantaten von Prostata-Karzinomen gezeigt (Pili, 2001). Unter

Behandlung mit Butyrat hat Velazquez nachgewiesen, dass die Aussaat von Lebermetastasen sowie das Tumorwachstum im Mausmodell gehemmt wurden (Velazquez, 1996).

Da Butyrat eine antiproliferative und differenzierende Wirkung auf Tumorzellen ausübt, erschien es von Interesse, die Frage der durch Butyrat vermittelten Expressionsverminderung der Angiogenesefaktoren zu untersuchen. Hierbei wurde vor allem die Hemmung des Vascular Endothelial Growth Factor VEGF und dem dazugehörigen Rezeptor FLT-1 (fms-like Tyrosin Kinase-1) in humanen Kolonkarzinom Zelllinien untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Materialien und Geräte

##### Chemikalien:

PBS, Phosphate Buffered Saline Dulbeccos`, Life Technologies, Rockville MD, USA

Trypanblau, Trypan Blue Stain 0,4%, Life Technologies, Rockville MD, USA

Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) 1%, Life Technologies, Rockville MD, USA

Butyrat Na-Salz; Sigma-Aldrich, Deisenhofen

##### Mediumzusatz:

0,4% HEPES Buffer, Life Technologies, Paisly, UK

1% L-Glutamin, Life Technologies, Paisly, UK

1% Non Essential Amino Acids (NEAA), Life Technologies, Paisly, UK

10% FBS (Fetal Bovine Serum), Life Technologies, Paisly, UK

2% Penicillin/Streptomycin, Life Technologies, Paisly, UK

##### Zelllinien:

CX1, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

HCT15, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

HT29, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

SW480, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

SW620, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

##### Medien:

Life Technologies, Rockville MD, USA

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

MEM (Minimum Essential Medium)

RPMI 1640 – Medium (21875-031)

RPMI 1640 – Medium (21875-034)

Geräte und Material:

2 ml Eppendorf-Gefäße, Eppendorf, Hamburg

Brutschrank B5060, Hereus, Hanau

Gefrierschrank -70°C, Thermo forma Marietta OH, USA

Heraeus Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Hanau

Kulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, Costar, Camebridge MA, USA

Neubauer-Zählkammer Bright Line 10 µl, Schott Glas, Mainz

Sterilwerkbank Gelaire BSB 4, Bioflow Technik, Meckenheim

Silikonisierte 1.5 ml Eppendorf-Gefäß, Sorenson, West Salt Lake City, Utah, USA

## 2.1.2 Zelllinien

Für die Versuche wurden verschiedene Zelllinien verwendet. Die Zelllinien HT29, CX1 und HCT15 stellen Linien wenig fortgeschrittener kolorektaler Karzinome dar. HCT15 weist im gegensatz zu HT29 und CX1 keine Mutation im p53 Suppressorgen auf.

Die Zelllinien SW480 und SW620 stammen von einem gemeinsamen Primärtumor. Bei den SW620 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie die aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen wurde. Die jeweils verwendeten Medien stammen von Life Technologies und sind in Tab.3 aufgeführt.

Zelllinie	Herkunftsort	Medium
HT29	Humanes Colon Adenokarzinom °I ; 44jähr. Frau	MEM (21090-022)
CX1	Humanes Colon Adenokarzinom °I ; 44jähr. Frau	DMEM (31885-023)
HCT15	Humanes Colon Adenokarzinom	RPMI 1640 (21875-031)
SW480	Humanes Colon Adenokarzinom °IV; 50jähr. Mann	RPMI 1640 (21875-034)
SW620	Lymphknotenmetastase bei Colon Adenokarzinom °IV; 50jähr. Mann; Metatstasenzelllinie von SW480	DMEM (31885-023)

**Tab.3: Verwendete Zelllinien, deren Herkunftsorte und Medien**

### 2.1.3 Kultivierung

Zur Kultivierung der verschiedenen Zellen wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in  $75 \text{ cm}^3$  Kulturflaschen ausgesät und für 72 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  vermehrt. Zu den verwendeten Medien siehe Tab.3.

Um eine Synchronisation der Zellzyklen zu erreichen, wurden die Zellen anschließend 6 Stunden mit serumfreiem Medium inkubiert. Nach Zusatz von 10% FBS (Fetal Bovine Serum) wurde das Wachstum der Zellen für 12 Stunden fortgesetzt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit Na-Butyrat-Salz in Konzentrationen von 2-8 mmol. Butyrat wurde hierfür in destilliertem Wasser gelöst. Die Kontrollen wurden analog ohne den Zusatz von Na-Butyrat behandelt.

Nach 0, 2, 8, 24 und 48 Stunden wurden die Zellen für die RNA-Analyse abgeerntet. Hierzu wurde das Medium abpipettiert und bei  $4^\circ\text{C}$  und 900U für 10 min zentrifugiert (Heraeus Labofuge 400R). Der zellfreie Überstand wurde zur Proteinanalyse auf 2 ml Eppendorf-Gefäße verteilt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Die adhärenen Zellen wurden zunächst mit 5 ml PBS und dann mit 4ml Trypsin-EDTA 1% gewaschen, Anschließend für 5 min mit 3 ml Trypsin-EDTA bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und von der Unterlage abgeklopft. Die Trypsinierung wurde mit 7,5 ml Medium gestoppt. Aus der Zellsuspension wurden 0,5 ml für die Zellzählung verwendet. Die restlichen 10 ml wurden bei 900U für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt. Die Pellets wurden mit 10 ml PBS gewaschen, in 1ml PBS gelöst und in silikonisierte 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurden die Pellets in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Zahl der adhärenen Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 0,5 ml der Zellsuspension mit 0,5 ml Trypanblau in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß vermischt und 10 min inkubiert und  $10 \mu\text{l}$  in die Neubauer-Zählkammer gegeben. In vier Quadranten wurden die vitalen Zellen (Trypan-negativen) gezählt. Die Zellzahl für eine 10ml Suspension wurde anhand der Formel  $\Sigma \times 50000$  Zellen berechnet.



## 2.2 RNase Protection Assay

### 2.2.1 Materialien und Geräte

#### Chemikalien:

2-Mercaptoethanol 98%, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Urea, Merck, Darmstadt

Mineralöl, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Biotin RNA Labeling Mix, Boehringer, Mannheim

Chloroform, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Isoamyl Alkohol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

DEPC, Diethylpyrocarbonat, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

100% Ethanol, Boehringer, Mannheim

30% Acrylamid, Boehringer, Mannheim

Tris-saturated phenol, pH 8,0, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

#### Geräte und Materialien

silikonisierte 1,5 ml Eppendorf-Gefäße, Sorenson, West Salt Lake City, Utah, USA

2ml Eppendorf-Gefäße, Eppendorf, Hamburg

Autoklav, Fedegari, Italien

Elektroblottingkammer Trans Blot System, BioRad, Hercules, CA, USA

Elektrophoresekammer, BioRad, Krefeld

Filmentwicklungsautomat, Protec Gerätebau GmbH, Oberstfeld

Filterpapier, Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schnell, Dassel

Gefrierschrank -20°C, Bosch, Stuttgart

Heizblock, Ismatec, Wertheim-Mondfeld

Membran Immobilion-membrane, Milipore, Bedford MA, USA

Pipetten ( 10, 20, 100, 200, 1000 µl), Eppendorf, Hamburg

Plastikfolie Cofresco, Minden

Photometer, Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

QIASHredder Säulen Quiagen, Germantown MD, USA

Röntgenfilm Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK

UV-Tisch, Biometra TI3, Biometra, Göttingen

Vortexgerät, Vortex Genie 2, Bender & Hohlbein AG, Zürich, CH

Wasserbad, Köttermann, Uetze/Hänigsen

Zentrifuge Heraeus Biofuge fresco, Heraeus, Osterode

In vitro transcription Kit: Pharmingen, San Diego, CA, USA

RNasin

DTT, 100 mmol Dithiothreitol, in H<sub>2</sub>O

5x Transcription Buffer

T<sub>7</sub> RNA Polymerase

Rnase-freie Dnase

20 mmol EDTA

Yeast RNA

Ammoniumacetat

Nonisotopic Detection Kit: Ambion, TX, USA

5x Wash Buffer

10x Blocking Buffer

Streptavidin-Alkaline Phosphatase

Assay Buffer

CDP-Star<sup>®</sup>

RiboQuant Multi-Probe RNase Protection Assay System, Pharmingen, San Diego CA, USA

Ammoniumacetat

Hybridisation Buffer

RNase Buffer

RNase A+T<sub>1</sub> Mix

Proteinase K Buffer

Proteinase K

Yeast t-RNA

1x Loading Buffer

RNeasy Mini Kit: Quiagen, Germantown MD, USA

Buffer RLT 1µl β-Mercaptoethanol auf 1ml RLT Buffer

Buffer RW1

Buffer RPE

RNase-free H<sub>2</sub>O

RNeasy mini spin Säulen

10x TBE

in DEPC-H<sub>2</sub>O

0,9 mol Tris-Base, Merck, Darmstadt

0,9 mol Borsäure, Merck, Darmstadt

22 mmol EDTA pH 8,0, Gibco BRL, Eggenstein

Template set: Pharmingen, San Diego, CA, USA

Custom Template (#559660-13853, Quote#:13853)

<b>Faktor</b>	<b>Funktion</b>
<b>FLT-1</b>	VEGF-Rezeptor-1
<b>FLT-4</b>	VEGF-Rezeptor-3
<b>p53</b>	Tumorsuppressorgen
<b>c-fos</b>	Protoonkogen
<b>FAF10</b>	Fas assoziierter Faktor 10
<b>bcl-2</b>	Apoptose-Regulationsprotein
<b>VEGF</b>	Angiogenesefaktor
<b>L32</b>	Ladungskontrolle
<b>GAPDH</b>	Ladungskontrolle

**Tab. 4:** h-Custom Template Set Faktoren

## 2.2.2 RNA Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Germantown MD, USA). Die einzelnen Schritte wurden, wenn nicht näher beschrieben, bei Raumtemperatur ausgeführt.

Zur Lysierung wurden die aufgetauten Zellpellets mit 600 µl mit β-Mercaptoethanol versetztem RLT Puffer gelöst.

Zur Homogenisierung der Proben wurden die Zelllysate auf die QIAshredder pipettiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 10000U (Heraeus Biofuge fresco) wurden die QIAshredder verworfen und das Homogenisat mit 600 µl 70% Ethanol durchmischt.

Die RNA-Isolation erfolgte durch Aufpipettieren von 700 µl der Probe auf die RNeasy mini spin Säulen. Anschließend wurden die Säulen 1 min bei 10000U zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Der Rest der Probe wurde ebenfalls in die RNeasy mini spin Säulen überführt.

Die in der Säule sitzende RNA wurde nun gelöst. Dafür wurden 700 µl RW1 Puffer (RNeasy Wash 1 Buffer) auf die RNeasy mini spin Säulen pipettiert, diese für 1 Minute bei 10000U zentrifugiert. Anschließend wurden die RNeasy mini spin Säulen auf 2 ml Eppendorf-Gefäße gestellt. Die sich in der Membran der Säulen befindende RNA wurde mit 500 µl des mit 96-100% Ethanol versetzten Buffer RPE (4 Volumen Ethanol 96-100% auf ein Volumen Buffer RPE) durch Aufpipettieren und anschließende Zentrifugation (1min, 10000U) gewaschen. Dieser Vorgang wurde nach Verwerfen des Zentrifugates wiederholt.

Die Eluation der RNA erfolgte durch Aufsetzen der RNeasy mini spin Säulen auf neue 1,5ml Eppendorf-Gefäße und zweimaliges Auftropfen von 50µl RNase freiem H<sub>2</sub>O mit anschließender Zentrifugation über 1 Minute bei 10000U.

Um RNase freies Wasser zu erhalten, wurde ddH<sub>2</sub>O mit DEPC (Diethyl Pyrocarbonat) behandelt und anschließend autoklaviert.

Die Konzentrationsmessung der RNA (gelösten in 100µl RNase freiem H<sub>2</sub>O) erfolgte am Photometer bei 260nm (Pharmacia Biotech Ultraspec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Verdünnung bei der Messung betrug 1:100, entsprechend 10µl RNA-Isolat + 990µl RNase freiem H<sub>2</sub>O. Eine Absorption von 1 entsprach hierbei 40 µg RNA/ml. Die Konzentration der Probe (µg/ml) wurde nach der Formel  $40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$  ausgerechnet, somit entsprach die RNA-Menge der Konzentration (µg/ml) multipliziert mit dem Probenvolumen (ml).

Die Reinheit der RNA wurde mit dem Verhältnis  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  überprüft, wobei nur Proben verwendet wurden deren Verhältnis zwischen 1,4-1,7 lag.

### 2.2.3 Sondenherstellung

Zur Sondenherstellung wurde das *in vitro* transcription Kit von Pharmingen benutzt. Im ersten Schritt wurden 9  $\mu$ l DEPC- $H_2O$ , 1  $\mu$ l RNasin, 2  $\mu$ l DTT, 4  $\mu$ l 5x Transcription Buffer, 1  $\mu$ l RPA Multi probe Template set (Custom Template, h-Angio-2, hAPO-3), 2  $\mu$ l Biotin RNA Labeling Mix, 1  $\mu$ l T7 RNA Polymerase zusammen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Dieses Gemisch wurde gut vermengt und für 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 2  $\mu$ l RNase-freie DNase zugegeben, gut vermischt, kurz zentrifugiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 26  $\mu$ l 20 mmol EDTA, 25  $\mu$ l Tris-saturated phenol, 25  $\mu$ l Chloroform:Isoamyl Alkohol (50:1) und 2  $\mu$ l yeast tRNA zugegeben, vermischt und für 5 min bei 20-25°C und 10000U zentrifugiert. Von den sich gebildeten zwei Phasen wurde die obere (50  $\mu$ l) in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 50  $\mu$ l Chloroform:Isoamyl Alkohol (50:1) vermischt und zentrifugiert (2 min, 10000U, 20-25°C). Im folgenden Schritt wurde erneut die oberste Phase in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, mit 50  $\mu$ l 4 mol Ammonium Acetat und 250  $\mu$ l 100% eiskaltem Ethanol versetzt und für 30 min bei -70°C inkubiert (Boeringer Mannheim) und über 15 min bei 4°C mit 13000U zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, die Pellets mit 100  $\mu$ l 90% eiskaltem Ethanol versetzt und erneut bei 4°C für 5 min mit 13000U zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes, Trocknen der Pellets für 10 min bei Raumtemperatur wurden diese in 50  $\mu$ l Hybridisierungs Puffer gelöst und 2 min bei 10000U zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

## 2.2.4 RNase Protection Assay (RPA)

Für den Ribonuclease Protection Assay wurde das RiboQuant Multi-Probe RNase Protection Assay System von Pharmingen verwendet.

Von der in DEPC-H<sub>2</sub>O gelösten zu untersuchenden RNA wurden 5 µg (vgl. 2.2.1 RNA-Isolation) in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert, mit 50 µl 4mol Ammoniumacetat und 250 µl eiskaltem 100% Ethanol versetzt. Nach Zugabe von 8 µl Hybridisations Puffer wurden die Pellets durch vortexen gelöst. Die gelöste RNA wurde mit 2 µl des Biotin-markierten Templates vermischt und bei 56°C für 12-16 Stunden im vorgewärmten Wasserbad inkubiert. Um ein Verdampfen zu verhindern wurde ein Tropfen Mineralöl zugegeben.

Für insgesamt 12 Proben wurde ein RNase Cocktail aus 1,5 ml RNase Buffer und 3,6 µl RNase A + T1 Mix hergestellt. 100 µl dieses Cocktails wurden unter die Ölschicht jeder Probe pipettiert, kurz zentrifugiert und dann für 45 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Für den nächsten Schritt wurde ein Proteinase-K-Cocktail zubereitet. Für 12 Proben wurden 234 µl Proteinase K Buffer, 18 µl Proteinase K und 18 µl yeast tRNA vermischt. 18µl dieses Proteinase-K-Cocktails wurde pro Probe in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Anschließend wurde das sich unter der Ölschicht befindende RNase-Produkt in die mit Proteinase-K-Cocktail versetzten Eppendorf-Gefäße gegeben, vermischt und für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 65 µl Tris-saturated Phenol und 65 µl Chloroform: Isoamyl-Alkohol (50:1) wurden die Proben bei 20-25°C für 5 min und 10000U zentrifugiert. Von den entstandenen zwei Phasen wurde die obere in ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 120µl 4mol Ammoniumacetat und 250µl eiskaltem 100% Ethanol vermischt und für 30 min bei -70°C inkubiert, 15 min bei 4°C und 13000U zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend 30 s auf dem Vortex-Gerät in 5,5µl 1x Loading Buffer gelöst und kurz abzentrifugiert. Abschließend wurden die Proben für 3 min bei 90°C auf dem Heizblock erhitzt und bis zu weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Von den Proben wurden jeweils 5 µl in die Taschen des Gels geladen. Die Kontrolle bestand aus 1:750 mit Loading Buffer verdünnten unhybridisierten Template.

Die Elektrophorese wurde mit Hilfe eines 6% Acrylamid/ 8 mol Harnstoff-Gels durchgeführt. Hierfür wurden 14,4 g Harnstoff, 3 ml 10x TBE, 6ml 30% Acrylamid und 18 ml DEPC-H<sub>2</sub>O vermischt und bei 37°C gelöst. Die Lösung wurde mit 240µl 10%

Ammoniumpersulfat in DEPC-H<sub>2</sub>O und 32µl TEMED vermischt und zügig in der Elektrophoresekammer gegossen. Die Elektrophorese lief mit 200V für 55 min. Als Elektrophorese Puffer wurden 750 ml 1xTBE verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten RNA-Abschnitte auf eine Membran (Immobilion-membrane) mittels Elektroblothing mit 200mA über 50 min überführt. Als Puffer hierzu wurden 750 ml 0,5x TBE benutzt.

Die RNA wurde anschließend 2 min durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert.

Der enzymatische Biotin-Nachweis erfolgte mit Hilfe des Bright Star Bio Detect Nonisotopic Detection Kit von Ambion. Hierfür wurden mehrere Waschschriffe mit verschiedenen Puffern durchgeführt. Wash Buffer für 2 x 5 min, gefolgt von 2 x 5 min und 30 min Blocking Buffer. Entscheidender Schritt zum Biotin Nachweis war die Reaktion mit Streptavidin Alkaline (Ambion) in einer 1:1000 Verdünnung mit Blocking Buffer für 30 min. Die chemilumineszierende Lösung, CDP-Star<sup>®</sup>, wurde nach weiteren Waschschriffen, 10 min Blocking Buffer, 3 x 5 min Wash Buffer und 2 x 2 min Assay Buffer, für weitere 5 min zugegeben. Dann wurde die Membran auf Filterpapier angetrocknet, in Plastikfolie eingepackt und auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) gelegt. Dieser wurde dann von der Membran belichtet. Nach Entwicklung des Films sind die Biotin-markierten, hybridisierten RNA-Abschnitte zu sehen. Anhand des Markers können die Proben beurteilt werden.

## 2.3 Western Blot

### 2.3.1 Materialien und Geräte

#### Antikörper:

VEGF, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

p53, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

#### Chemikalien:

BSA Fraction V, Boehringer Mannheim

Diazyldhydrazid

Polyacrylamid, Boehringer Mannheim

SDS-PAGE Standards, BioRad, Hercules, CA, USA

Tris-HCl, Merck, Darmstadt

Urea, Merck, Darmstadt

#### Geräte und Materialien:

Elektroblottingkammer, Trans Blot System, BioRad, Krefeld

Elektrophoresekammer, BioRad, Krefeld

Eppendorf Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg

Gefrierschrank -70°, Thermo forma Marietta OH, USA

Heizblock, Ismatec, Wertheim-Mondfeld

Photometer, Tecan-Spectra-Spektroskop, Tecan, Crailsheim

Plastikfolie Cofresco, Minden

PVDF-Membran, Immobilon-membrane, Milipore, Bedford MA, USA

Röntgenfilm Hyperfilm ECL, Amersham

Silikonisierte 1,5 ml Eppendorf-Gefäße, Sorenson, West Salt Lake City, Utah, USA

Ultraschall, Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin

Vortexgerät, Vortex Genie 2, Bender& Hohbein AG, Zürich, CH

#### Lösungen:

##### BSA-Buffer

bei pH 7,5

6% BSA

20 mmol Tris-HCl, Merck, Darmstadt



0,5 mmol NaCl, Merck, Darmstadt

0,1% Natriumazid, Merck, Darmstadt

#### Lysis Buffer:

in ddH<sub>2</sub>O bei pH 7,4 gelöst

Tris-HCL 20 mmol, Merck, Darmstadt

1 mmol EDTA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

50 µmol Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

50 mmol NaF, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

0.01 Units/ml Aprotinin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

1 µmol PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

1 mmol Elastinal, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

10 µg/ml Pepstatin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

#### Sample Buffer:

in 1x Stacking Buffer

10% Glycerol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

0,4% Laurylsulfat (SDS), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

0,3% Bromphenolblau, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

0,2% Pyronin Y Sigma, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

#### Stacking Buffer:

in ddH<sub>2</sub>O gelöst

0,5 mmol Trisbase,

0,8% SDS

20% 2-Mercapto-ethanol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

#### 5% Trockenmilchpulver

in TBS

5% Trockenmilchpulver, Fluka-BioChemika, Buchs, CH

0,1% Tween 20, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

0,1% Natriumazid, Merck, Darmstadt

#### TBS:

in ddH<sub>2</sub>O

10 mmol Tris-HCL

150 mmol NaCl, Merck, Darmstadt

Ponceau S:

in ddH<sub>2</sub>O

0,1% Ponceau S Sigma-Aldrich, Deisenhofen

5% acetic acid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Kits:

BioRad DC Protein Assay, BioRad, Hercules CA, USA

ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK

SDS-PAGE, Protean II Cell, BioRad, Hercules, CA, USA

### 2.3.2 SDS-Page, Blotting und Färbung

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellpellets wurden in  $200\ \mu\text{l}$   $4^{\circ}\text{C}$  kaltem Lysis Buffer gelöst und für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Sonoplus GM70). Danach wurden die Lysate bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 min bei 7500U zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415) und der Überstand in ein neues, silikonisiertes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde photometrisch bei 750 nm (BioRad DC Protein Assay; Tecan-Spectra-Spektroskop) ermittelt und mit einer Rinderalbumin-Standardkurve (BSA Fraction V) verglichen.  $70\ \mu\text{l}$  Sample Buffer gelöst in 1x Stacking Buffer wurden zu den Lysaten gegeben. Nach Mischen auf dem Vortexgerät wurden die Proben 3 min lang im Heizblock auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und dann 5 min auf Eis gestellt. Die Proben ( $10\text{-}50\ \mu\text{g}$  pro lane) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wobei die Polyacrylamidkonzentration variierte.

Als Marker für die Proteingröße wurden zusätzlich noch  $10\text{-}15\ \mu\text{l}$  SDS-PAGE Standards von BioRad geladen.

Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch mittels Elektroblothing bei  $400\text{-}650\ \text{mA}$  auf eine PVDF-Membran (Immobilion-membrane) überführt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen mit 5% Trockenmilchpuffer 2 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Nach Waschen der Membran in TBS mit 0,1% Tween 20 (3 x 30 sec, 1 x 10 min) wurde die Membran für 2-3 Stunden mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach mehreren Waschgängen mit TBS 0,1% Tween 20, erst 3 x 30 sec und dann 3 x 15 min, einem weiteren Blockierungsschritt in 5% Milchpuffer für 30 min und nochmaligem Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20, 2 x 30 sec und 1 x 10 min folgte die Inkubation der Membran mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper.

Nach weiteren Waschsritten, 3 x 30 sec und 2 x 15 min, wurde der Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System) nachgewiesen. Durch Oxidation von Diazylhydrazid konnte die nachfolgende Lichtemission einen Röntgenfilm belichten und somit das Protein sichtbar machen. Die Belichtungszeiten waren von den verwendeten Proben abhängig.

Die Blottingmembranen wurden anschließend in Plastikfolie eingepackt und bei 4°C gelagert. Um die Gleichmässigkeit der einzelnen Proteinbahnen zu überprüfen, wurde die Blottingmembran entweder nach dem Blottingschritt oder nach der Antikörperfärbung in destilliertem Wasser gewaschen und mit Ponceau S angefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit destilliertem Wasser entfernt.

#### Antikörper

Die Primärantikörper für VEGF und FLT-1 waren von Santa Cruz. Sie stammten vom Kaninchen. Die Antikörper wurden in BSA-Buffer (6% BSA, 20 mmol Tris-HCL, 0,5 mmol NaCl, 0,1% Natriumazid, pH 7,5) gelöst. Anschließend wurden sie 40 min auf der Blottingmembran bei 20-25°C inkubiert. Die Inkubationszeit des Sekundärantikörpers betrug eine Stunde.

## 2.4 ELISA

### 2.4.1 Materialien und Geräte

Quantikine ELISA-Kit human VEGF, R&D Systems, Minneapolis MN, USA;

RD5K

Farbreagenzien A und B

Assay Deluent RD1W

Wash Buffer

VEGF Konjugat

Stop Solution

VEGF Microplates, R&D Systems, Part 890218

Geräte und Materialien:

Photometer, Tecan-Spectra-Spektroskop, Tecan, Crailsheim

silikonisiertes Eppendorf-Gefäß

Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000), Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen, Eppendorf, Hamburg

Paraffin

### 2.4.2 Assay

Für die quantitative Analyse der VEGF-Konzentration wurde der Quantikine ELISA-Kit human VEGF von R&D Systems verwendet.

Die Proben bestanden aus zellfreiem Mediumüberstand, welches bei der Inkubation mit Butyrat mit nur 1% FBS versetzt wurde, da FBS selbst VEGF enthält. Die Menge an FBS bei Inkubation mit Butyrat wurde von 10% auf 1% reduziert. Dies war erforderlich, um die Fehlerquelle so gering wie möglich zu halten, ohne das Zellwachstum zu behindern. In der weiteren Analyse kommt das im FBS enthaltene VEGF nicht zum Tragen, da alle Proben die gleiche Grundmenge enthielten.

Alle verwendeten Reagenzien stammten von R&D-Systems und wurden bei Raumtemperatur verarbeitet. Vorbereitet wurden der Wash Buffer, welcher mit ddH<sub>2</sub>O (20 ml: 480 ml) verdünnt werden musste. Die Substratlösung, welche für die Farbreaktion verantwortlich ist,

musste unmittelbar vor der Verwendung aus den Farbreagenzien A und B im gleichen Verhältnis hergestellt werden. Pro Well wurden hiervon 200  $\mu$ l benötigt.

Der VEGF-Standard wurde mit 500  $\mu$ l RD5K gelöst. Es wurde mit 7 Röhrchen in denen sich jeweils 500  $\mu$ l RD5K befanden eine Verdünnungsreihe pipettiert (2000 pg/ml- 1000 pg/ml- 500 pg/ml- 250 pg/ml- 62,5 pg/ml- 31,2 pg/ml- 15,6 pg/ml).

Der Assay wurde in den VEGF Microplates durchgeführt. In das Well wurden 50  $\mu$ l des Assay Deluent RD1W und 200  $\mu$ l des Standards bzw. der Probe pipettiert. Die Platte wurde anschließend mit Paraffin abgedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden das Well mit Wash Buffer 3 x gespült. Anschließend wurden 200  $\mu$ l VEGF Konjugat in jedes Well gegeben, wieder mit Paraffin abgedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 200  $\mu$ l Substratlösung in jedes Well gegeben und diese dann für 20 min vor Licht geschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurden 50  $\mu$ l Stop Solution zugegeben.

Die Messung erfolgte im Photometer (Tecan-Spectra-Spektroskop, Tecan, Crailsheim) bei 450 nm innerhalb der nächsten 15 min.

Zur Ergebnisauswertung wurde das Programm von Tecan-Spectra-Spektroskop benutzt und die statistische Auswertung erfolgte mittels Box Plot.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Butyrat auf die mRNA-Expression von Angiogenesefaktoren und deren Rezeptoren

Auf RNA-Ebene wurden bei den Zelllinien HT29, HCT15, CX1, SW480 und SW620 verschiedene Angiogenesefaktoren mittels RNase Protection Assays untersucht.

##### 3.1.1 HT29

Die Zelllinie HT29 zeigte bei Inkubation mit Butyrat einen Abfall der VEGF-mRNA-Expression. Die Abnahme der VEGF-mRNA-Synthese war unter Butyrat unabhängig von der Dosis. Sowohl die Inkubation mit 2 mmol als auch mit 6 mmol Butyrat zeigte gleichwertige Ergebnisse. Unter Butyrat-Behandlung kam es zu einem Abfall der VEGF-Expression nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden, mit dem deutlichsten Ergebnis nach 24 Stunden.

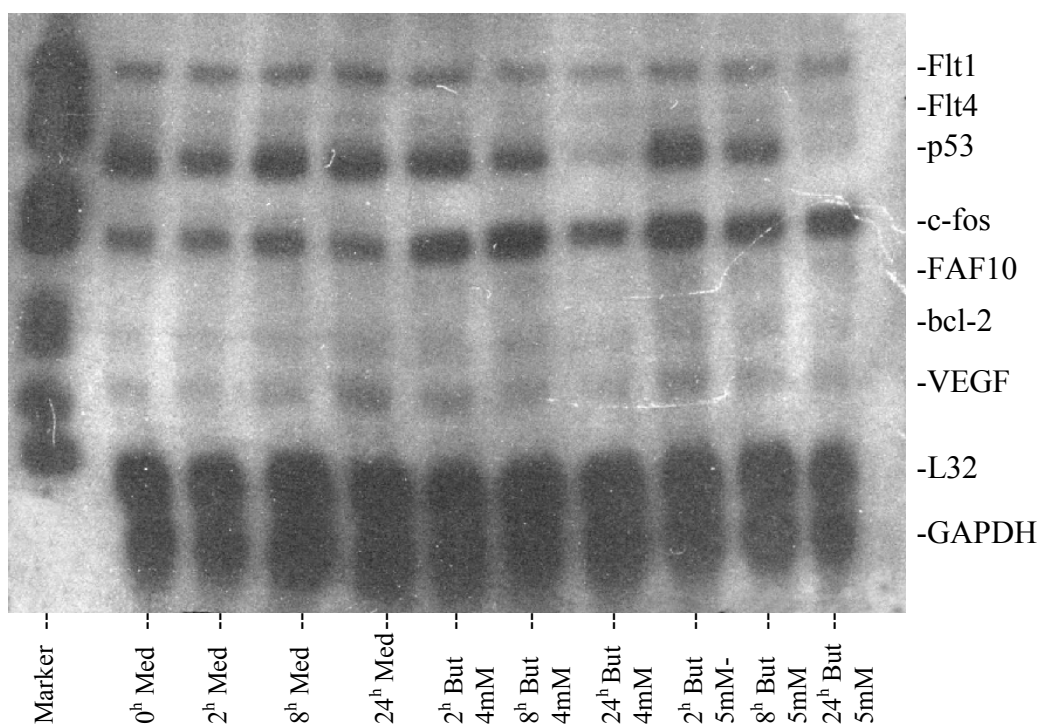
Der VEGF-Rezeptor 1 (FLT-1) konnte auf mRNA-Ebene bei der Zelllinie HT29 durch Butyrat in der Expression gehemmt werden. Diese Veränderung war unabhängig von der verwendeten Butyratkonzentration. Sowohl eine Inkubation mit 2 mmol Butyrat führte zu diesem Ergebnis als auch eine Inkubation mit 5 mmol Butyrat. Bereits nach 8 Stunden deutete sich das Ergebnis an, jedoch am deutlichsten detektierbar wurde es nach 24 Stunden.

Das mutierte Tumorsuppressor-Gen p53<sup>mut</sup> reagierte auf die Inkubation mit Butyrat mit einer Abnahme der mRNA-Synthese. Bereits bei einer Konzentration von 2 mmol Butyrat wurden diese Veränderungen sichtbar. In höheren Konzentrationen zeigte sich lediglich eine deutlichere Differenz zur Mediumkontrolle, allerdings blieb die Abnahme der Expression deutlich sichtbar. Die Veränderungen im Tumorsuppressorgen waren nach 24 Stunden Inkubation mit Butyrat nachweisbar.

Als Kontrolle für die durch Butyrat induzierte Hyperacetylierung wurde ein entsprechender Zellversuch mit TSA in einer Konzentration von 500 µmol durchgeführt. TSA verursachte in vergleichbarer Weise eine Verminderung der VEGF-Expression entsprechend den Ergebnissen unter Butyrat. Auch für die Expression von FLT-1 zeigte die Inkubation mit

TSA vergleichbare Ergebnisse zu den durch Butyrat induzierten Veränderungen. Es kam somit zu einer Hemmung der Expression für FLT-1 und p53<sup>mut</sup>.

In der unbehandelten Mediumkontrolle zeigte sich eine Veränderung in der VEGF-mRNA Expression. Sie nahm unter Kontrollbedingungen kontinuierlich zu. Die sichtbare Erhöhung der VEGF-mRNA in der Kontrolle wurde in den mit Butyrat behandelten Zellen verhindert. Im Gegensatz zu der Expression von VEGF konnte bei der Expression von FLT-1 und p53<sup>mut</sup> keine Veränderung in den Mediumkontrollen festgestellt werden (Abb. 3). Die Versuche erfolgten über den Zeitraum von 24 Stunden.



**Abb. 3:** HT29 Zellen nach Inkubation mit 4 und 5 mM Butyrat über 24 Stunden.

### 3.1.2 CX1

Die Zelllinie CX-1 zeigte hinsichtlich der Inkubation mit Butyrat eine Variation in der Dosis- und Zeitabhängigkeit.

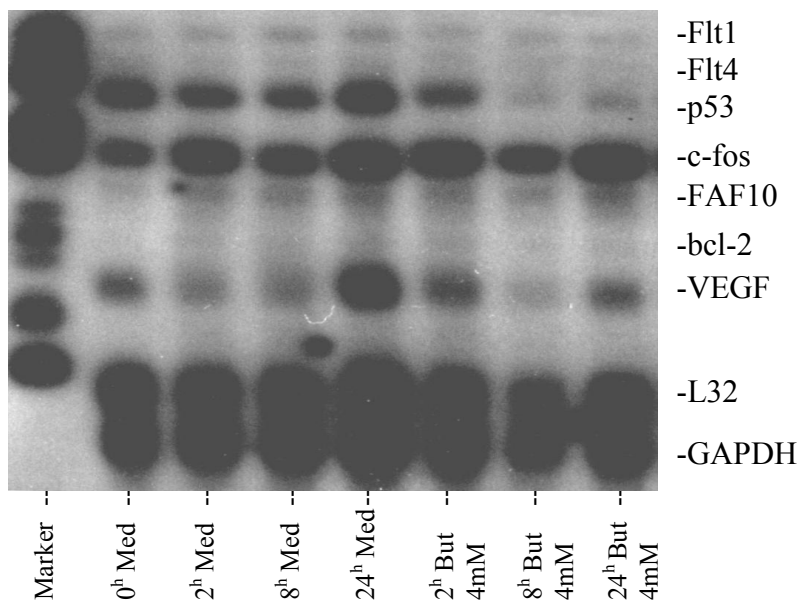
Hierbei war ein Abfall der VEGF-mRNA erst nach 24 Stunden und ab einer Konzentration von 4 mmol erkennbar.

Die VEGF-Rezeptor-1-Expression (FLT-1, VEGFR-1) konnte auf mRNA-Ebene bei den Zellversuchen mit der Zelllinie CX1 durch Butyrat gehindert werden. Dies war aber, im Gegensatz zu der Expression von VEGF, bereits nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden der Fall. Die benötigten Konzentrationen betragen 2 mmol Butyrat.

Bei der Zelllinie CX1 reagierte das mutierte  $p53^{mut}$  auf die Inkubation mit Butyrat mit einer Abnahme der mRNA-Synthese. Das Tumorsuppressor-Gen wurde wie bereits bei den HT29 Zellen nach 24 Stunden und einer Konzentration von 2 mmol Butyrat deutlich in der Expression gehemmt.

Die Kontrolle des zu Grunde liegenden Butyrat-Mechanismus mit TSA in der üblichen Konzentration von 500  $\mu$ M zeigte keine Unterschiede zu den durch Butyrat erzielten Ergebnissen für VEGF. Ebenso verhielt es sich für die Expressionen der mRNA des zugehörigen Rezeptors FLT-1- und des Tumorsuppressor-Gens  $p53^{mut}$ .

In der Mediumkontrolle zeigte sich das vergleichbare Phänomen hinsichtlich der Steigerung der VEGF-Expression wie bereits für die Zelllinie HT29. Es kam zu einer gesteigerten VEGF-Expression nach 24 Stunden Inkubation mit zusatzfreiem Medium. Hinsichtlich der FLT-1-Expression war ein leichter Rückgang nach 2 und 8 Stunden erkennbar. Allerdings übersteigt die Expression von FLT-1 nach 24 Stunden die des Nullwertes. Die Expression von  $p53^{mut}$  zeigte über den Zeitraum von 24 Stunden eine stetige Verstärkung.



**Abb.4:** CX1 Zellen nach Inkubation mit 4 mM Butyrat über 24 Stunden.



### 3.1.3 SW480

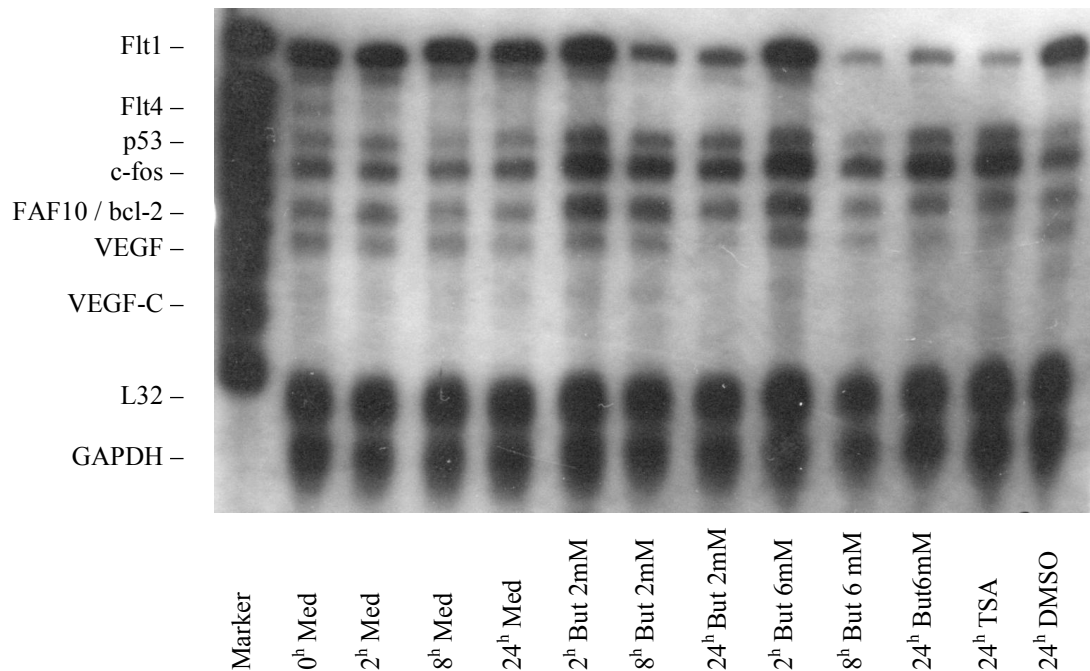
Unter Butyrat wurde bei der Zelllinie SW480 ein deutlicher Abfall der VEGF-mRNA nach 24 Stunden sichtbar. Bereits die geringste Konzentration (2 mmol) zeigte diesen Effekt, welcher auch in höheren Dosierungen (6 mmol) unverändert blieb.

Die FLT-1-Expression bei dieser Zelllinie verhielt sich entsprechend den Zelllinien HT29 und CX1. Die Abnahme der Expression des VEGF-Rezeptors-1 wurde nach Inkubation mit Butyrat bereits in niedriger Konzentration von 2 mmol sichtbar. Im Vergleich zu VEGF zeigte sich tendenziell eine stärkere Hemmung bei einer Konzentration von 6 mmol Butyrat.

Die mRNA-Synthese des p53<sup>mut</sup> Tumorsuppressor-Gens bei der Zelllinie SW480 zeigte nach Inkubation mit Butyrat eine Abnahme der Expression. Hierfür bedurfte es lediglich einer Konzentration von 2 mmol und eine Inkubationsdauer von 24 Stunden.

TSA führte nach Inkubation der Zellen mit 500µM über 24 Stunden ebenfalls zu einer Abnahme der VEGF-mRNA-Synthese. Auch die Expression von FLT1 und p53<sup>mut</sup> wurde in der TSA-Kontrolle gehemmt.

Die unbehandelte Mediumkontrolle zeigte keine sichtbare Veränderung in der VEGF-Expression über den Zeitraum von 24 Stunden. Entsprechend zeigte sich auch für die Expression von FLT1 und p53<sup>mut</sup> bei dieser Zelllinie keine Veränderung.



**Abb.5:** SW480 Zellen nach Inkubation mit 2 und 6 mM Butyrat über. Die Differenzierung zwischen FAF10 und bcl-2 ist nicht möglich. Bei diesem Blot wurde erstmals andeutungsweise VEGF-C sichtbar, jedoch ist eine Aussage diesbezüglich nicht zu treffen.

### 3.1.4 SW620

Die Zelllinie SW620 zeigte hinsichtlich der VEGF-Expression eine Abweichung zu den oben aufgeführten Zelllinien HT29, HCT15 und SW480.

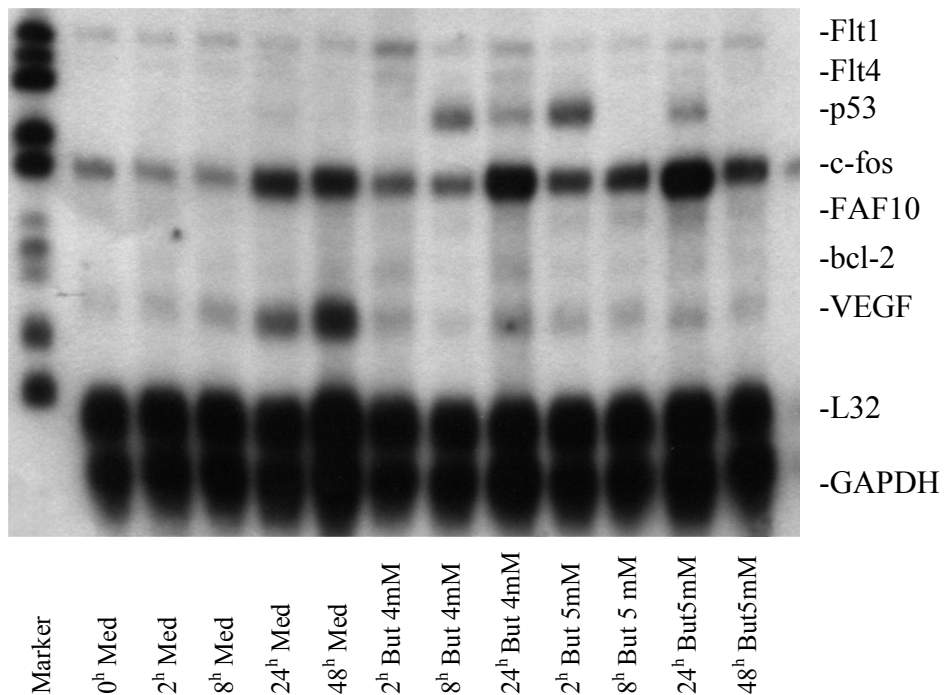
Der Abfall der VEGF-mRNA in den mit Butyrat behandelten Proben trat erst nach 48 Stunden und nicht bereits nach 24 Stunden in Erscheinung. Es war eine Konzentration von 4 mmol notwendig um die beschriebene Veränderung auszulösen.

Auffallend war wiederum, dass für die Zelllinie SW620 die Inkubation mit Butyrat zu einer gesteigerten Expression des VEGF-Rezeptors-1 führte. Eine Abhängigkeit von bestimmten Konzentrationen konnte nicht festgestellt werden.

Die Zelllinie SW620 zeigte nach Inkubation mit Butyrat bei einer Konzentration von 2mmol und einer Inkubationsdauer von 24 Stunden eine Abnahme der p53<sup>mut</sup>-mRNA-Expression.

Die TSA-Kontrolle für VEGF zeigte entsprechend den mit Butyrat behandelten Zellen eine Abnahme der VEGF-, FLT-1- und p53<sup>mut</sup>-mRNA-Expression.

Hinsichtlich der Mediumkontrolle ohne einen Zusatz von Butyrat war ein Anstieg der VEGF-Expression sichtbar, vergleichbar mit den bereits zuvor aufgeführten Zelllinien. Auch bei dieser Zelllinie wurden keinerlei Veränderungen der unbehandelten Mediumkontrollen in Bezug auf die Expression von FLT-1 und p53<sup>mut</sup> festgestellt. Auffallend hierbei war die kaum nachweisbare Expression des p53<sup>mut</sup> in der unbehandelten Mediumgruppe.



**Abb.6:** SW620 Zellen nach Inkubation mit 4 und 6 mM Butyrat über 24 und 48 Stunden.

### 3.1.5 Zusammenfassung

Butyrat führte bei den Zelllinien HT29, CX1, SW480 und SW620 zu einer Abnahme der VEGF-mRNA-Expression. Das mutierte Tumorsuppressor-Gen  $p53^{mut}$  reagiert auf Butyrat durch eine Abnahme der mRNA Synthese bei allen untersuchten Zelllinien. Allein bei der mRNA-Synthese des VEGF-Rezeptors-1 (FLT-1) zeigte sich nur für die Zelllinien HT29, CX1 und SW480 eine Abnahme der Synthese. Bei der Metastasen-Zelllinie SW620 führte die Inkubation mit Butyrat zu einem Anstieg der Synthese des VEGF-Rezeptors.

In den Mediumkontrollen konnte über den Zeitraum von 24 Stunden keine Veränderung der Expression des FLT-1 Rezeptors und des Tumorsuppressorgens  $p53^{mut}$  für die Zelllinien HT29, SW480 und SW620 festgestellt werden. Allein die Zelllinie CX1 zeigte unter Mediumbedingungen eine Zunahme der Expression. VEGF wurde unter Mediumbedingungen bei den Zelllinien HT29, CX1 und SW620 verstärkt synthetisiert. Bei der Zelllinie SW480 zeigte sich über 24 Stunden keine Veränderung der Expression.

Zelllinie	VEGF	FLT-1	$p53^{mut}$
HT29	↑	↔	↔
CX1	↑	↑	↑
SW480	↔	↔	↔
SW620	↑	↔	↔

*(a) Mediumkontrolle*

Zelllinien	VEGF	FLT-1	p53 <sup>mut</sup>
HT29	↓	↓	↓
CX1	verzögert ↓	beschleunigt ↓	↓
SW480	↓	↓	↓
SW620	verzögert ↓	↑	↓

*(b) Nach Inkubation mit Butyrat*

**Tab. 5:** Zusammenfassung der Veränderungen auf RNA-Ebene bei Inkubation mit Butyrat.  
(a) Mediumkontrolle, (b) Nach Inkubation mit Butyrat

### **3.2 Modulation der Proteinexpression von VEGF unter dem Einfluß von Butyrat bei den Zelllinien HT29 und HCT15**

Der Nachweis der Proteinexpression wurde für VEGF mit Hilfe der Western Blot Methode und eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt.

Um die mittels RPA nachgewiesenen Veränderungen der mRNA-Expression von VEGF auf Proteinebene nachzuweisen wurden Western Blot Assays gemacht. Der Versuch VEGF Protein-Produkte anhand des Western Blots nachzuweisen gestaltete sich in sofern schwierig, als dass sich bei der Durchführung und Betrachtung der Versuche zu viele unspezifische Banden darstellten. Es konnte auch durch verschiedene Marker keine eindeutige Zuordnung zu der entsprechenden Bande des VEGF-Produktes getroffen werden.

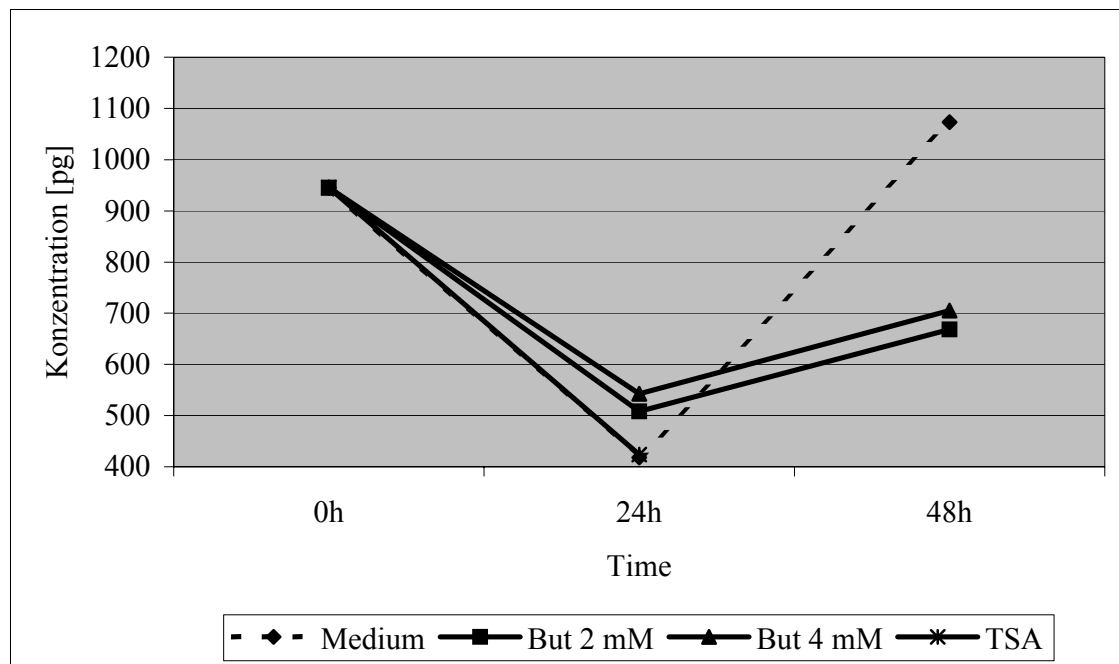
#### **3.2.1 ELISA**

Für die quantitative VEGF-Analyse wurde das Quantikine (ELISA)-Kit human VEGF von Quiagen benutzt.

Das Ziel dieser Untersuchung bestand darin, festzustellen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen Karzinomzellen, welche über eine Mutation im p53 Tumorsuppressorgen ( $p53^{mut}$ ) verfügen, und Karzinomzellen, die über ein intaktes p53 verfügen. Hierfür wurden die Zelllinie HT29, mit mutiertem p53, und die Zelllinie HCT15, ohne Mutation, miteinander verglichen.

Zu diesem Zweck wurde die Zellkultur etwas abgeändert. Die Zellen wurden mit Medium, welchem nur 1% Fetal Bovine Serum (FBS), statt den sonst üblichen 10% FBS zugesetzt war, inkubiert. Da im Serum VEGF enthalten ist, diente diese Veränderung der Minimierung dieses Störfaktors. Die Konzentration an FBS war ausreichend, um das Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Die Inkubation wurde mit Na-Butyrat in Konzentrationen von 2 und 4 mmol über 24 und 48 Stunden vorgenommen.

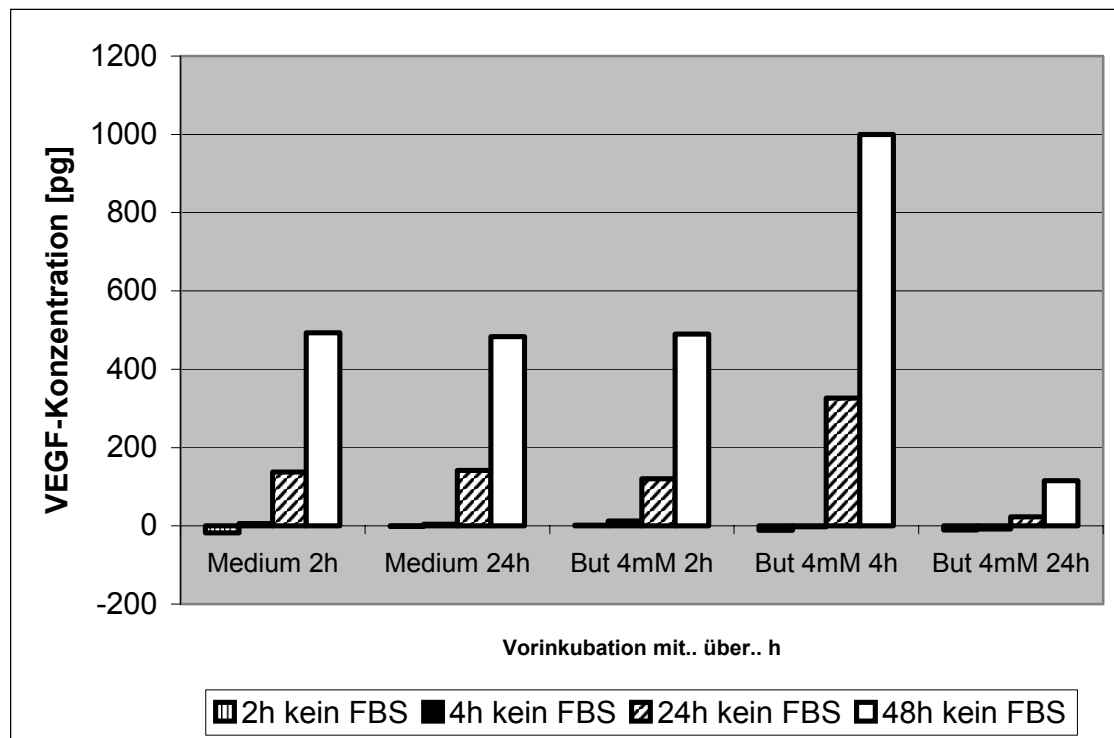
Anschließend wurde der zellfreie Mediumüberstand auf die unterschiedlichen VEGF Mengen hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es bei beiden Zelllinien unter Butyrat zu einer Absenkung der VEGF Synthese kommt.



**Abb. 7:** VEGF Konzentrationen von HT29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat 2 und 4 mmol nach 24 und 48 Stunden

Um die Serum-Starvation, die vor jedem Versuch durchgeführt wird, als mögliche Ursache dieser Ergebnisse auszuschließen, wurden ebenfalls Versuche gemacht mit unterschiedlichen Zeitintervallen bis zur erneuten Serum-Supplementation.

Zu diesen Ergebnissen ist zu sagen, dass die VEGF Konzentrationen im Medium der Zellen, welche eine Serum-Starvation durchgemacht hatten, deutlich höher waren als in den Kontrollen. Im weiteren Verlauf zeigten sich jedoch unveränderte Ergebnisse im Vergleich der beiden Gruppen. Einziger Unterschied war das Fehlen des Anstiegs der VEGF-Expression nach 4 Stunden bei den Zellen, welche kontinuierlich Serum erhalten hatten.

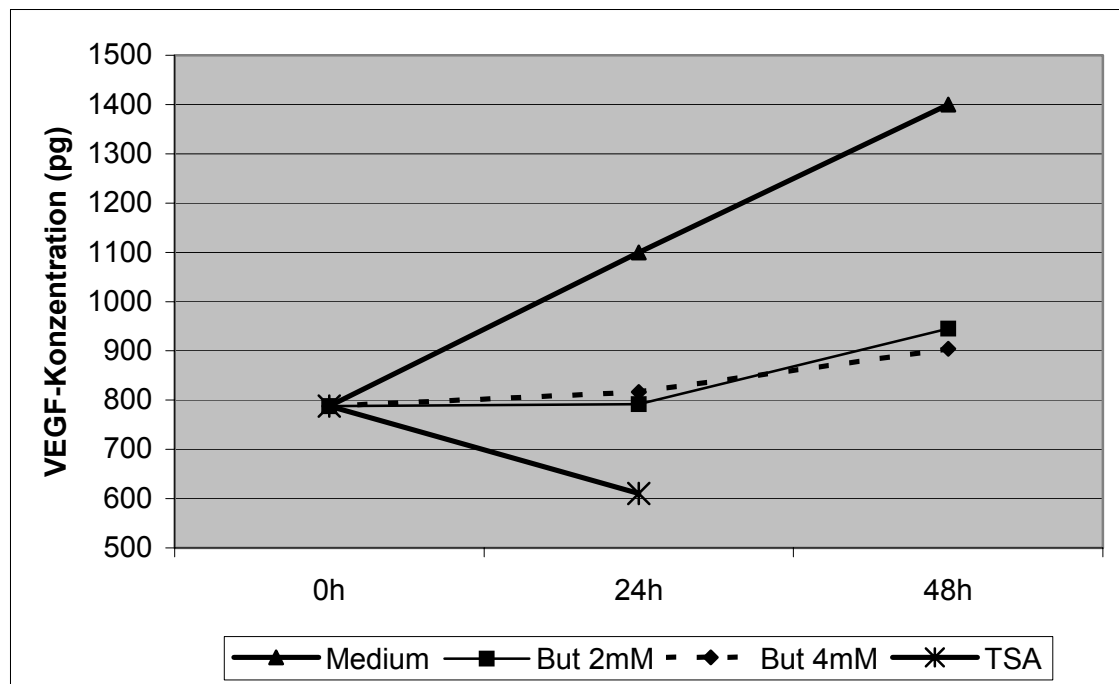


**Abb. 8: VEGF Konzentrationen von HT29 Zellen** nach Vorinkubation mit Medium bzw. Butyrat in Konzentrationen von 4mmol über 2, 4, und 24 Stunden ohne gleichzeitige Supplementation von FBS über 0, 2, 4, 24 und 48 Stunden. Bezüglich der Fehlenden Serum-Supplementation ist der 0 Stunden-Wert ist hier nicht dargestellt. Er zeigte jedoch keinen Unterschied zum 2 h-Wert.

Für die Zellen mit der Mutation des p53 (HT29) zeigten sich folgende Ergebnisse. Die beobachtete Zunahme der VEGF mRNA in den Mediumkontrollen resultierte nicht in einer Erhöhung der VEGF-Proteinkonzentration. Der Überstand nach 2 und 24 Stunden Inkubation mit zusatzfreiem Medium zeigte eine deutliche Abnahme der VEGF-Proteinsynthese. Erstaunlicherweise zeigte sich nach 4 Stunden eine deutliche Zunahme der VEGF-Expression bei den mit 4mmol Butyrat inkubierten Proben. Diese Proben zeigten allerdings nach 24 Stunden eine deutlich supprimierte Proteinexpression für VEGF.

Bei der Zelllinie HCT15, welche über ein wild-typ p53 Tumorsuppressorgen verfügt, zeigte sich nach Inkubation mit Butyrat in Konzentrationen von 2-6mmol nur ein minimaler Abfall der ohnehin deutlich geringeren VEGF Proteinsynthese. Dies war aber im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht deutlich.





**Abb. 9:** VEGF Konzentrationen von HCT15 Zellen nach Inkubation mit Butyrat 2 und 4 mmol nach 24 und 48 Stunden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Wirkung von Butyrat auf VEGF und FLT-1

Die Entwicklung eines invasiven Karzinoms benötigt nicht allein die Fähigkeit der Zelle, sich anzuhaften, zu proliferieren und durch Basalmembranen zu brechen. Ausschlaggebend ist die Fähigkeit der mutierten Zelle, sich ein entsprechendes Versorgungssystem durch Blutgefäße zu verschaffen. Sobald die Durchblutung eines Tumors gesichert ist, kann ein solider Tumor wie das Kolonkarzinom wachsen und gegebenenfalls metastasieren. Wichtige Faktoren hierfür sind unter anderen VEGF und der zugehörige Rezeptor FLT-1. VEGF ist eines der angiogenetisch wirksamsten und in diesem Zusammenhang, wichtigsten Proteine (Torimura, 1998; Ferrara, 1995).

Die verstärkte VEGF-Synthese ist einer der zugrundeliegenden Mechanismen, um eine pathologische Gefäßbildung auszulösen und steht somit am Anfang der Tumorentwicklung (Wong, 1999). VEGF<sub>165</sub> ist die dominierende Isoform und wird sowohl in gesunden als auch in transformierten Zellen exprimiert. Die Expression von VEGF wird in Tumorzellen durch Wachstumsfaktoren, genetische Veränderungen und Hypoxie moduliert. VEGF ist ein ebenso wichtiger angiogenetischer Faktor im Primarius wie auch in Metastasen kolorektaler Karzinome, mit wahrscheinlich prognostischer Aussagekraft (Takahashi, 1995). Frühere Untersuchungen mit immunhistologischen Methoden und Blutgefäßzählungen haben nahegelegt, dass die Expression von VEGF und die Anzahl an Blutgefäßen mit der Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung zusammenhängen. Bei diesen Untersuchungen konnte die Blutgefäßdichte mit Hilfe von VEGF-Antikörpern vermindert werden (Takahashi, 1995). Patienten mit Leberfiliae haben erhöhte VEGF-Levels, dies ist wiederum mit einer höheren mikrovaskulären Gefäßdichte assoziiert (Saclarides, 1994; Minagawa, 2002). In-vivo Studien haben ergeben, dass Patienten mit einem niedrigen Plasma-VEGF-Level eine weit bessere Prognose haben als Patienten mit erhöhten Werten (Takahashi, 1997).

Tokunaga et al. Zeigten, dass die Expression von VEGF<sub>189</sub>-mRNA mit dem Vorhandensein von Lebermetastasen und einer schlechten Prognose korrelieren (Tokunaga, 1998).

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation zeigen, dass Butyrat in der Lage ist, die Expression des Angiogenesefaktors VEGF zu hemmen. Unter Kontrollbedingungen nahm die Synthese von VEGF bei den Zelllinien HT29, CX1 und SW620 während des

Beobachtungszeitraumes zu. Dies ist mit den Daten von Werther et al. vereinbar. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass ab einem Duke D Stadium die im Blut nachweisbaren VEGF-Konzentrationen, im Vergleich zu Patienten mit weniger fortgeschrittenen Karzinomen, deutlich erhöht sind (Werther, 2000). Diese Ergebnisse eröffnen neue Möglichkeiten in Hinblick auf die Effekte der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auf Kolonkarzinomzellen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zeigten eine Abnahme der VEGF-mRNA-Expression bei Inkubation mit Butyrat in Konzentrationen ab 2 mmol über mindestens 24 Stunden. Bei der Metastasenzelllinie SW620 zeigte sich eine Abweichung zu den Zelllinien HT29, HCT15 und SW480. Der Abfall der VEGF-mRNA-Expression erfolgte in den behandelten SW620-Proben trat erst nach 48 Stunden und nicht bereits nach 24 Stunden. Auf Proteinebene zeigte sich im Mediumüberstand der mit Butyrat behandelten Zellen über 48 Stunden ein deutlicher Abfall der VEGF-Proteinmenge.

Die Zelllinien SW480 und SW620 wurden von Primarius bzw. Lymphknotenmetastase eines Karzinoms isoliert. Somit lassen die Linien SW480 und SW620 am ehesten Rückschlüsse auf ein Tumorsystem zu. Eine verzögerte Abnahme der VEGF-Expression in der Metastasenzelllinie deutet auf eine zusehens veränderte Struktur hin. Die Suppressor- bzw. Reparaturmechanismen sind bei zunehmendem Fortschreiten der Malignität zunehmend geschwächt. Jedoch zeigt das längere Einwirken von Butyrat weiterhin den vorbeschriebenen Effekt.

Da die Ausgangswerte sehr hohe VEGF Konzentrationen zeigten, wurde eine Versuchsreihe mit und ohne Supplementation von fetalem bovinem Serum (FBS) über verschiedene Zeitintervalle durchgeführt. Bei den Zellen, die kontinuierlich FBS erhielten, zeigten sich geringere Konzentrationen an VEGF als bei den Zellen, die über verschiedene Zeitintervalle einen Serumentzug erfahren hatten. Jedoch fiel auf, dass nach anschließendem Zuführen regulären Mediums die Zellen über 24 Stunden wieder die initialen VEGF-Konzentrationen erreichten. Alon et al. beschrieben VEGF in diesem Zusammenhang auch als Überlebensfaktor für neu geformte Blutgefäße (Alon, 1995).

Ein ähnliches Phänomen trat nach 4 Stunden Inkubation mit Butyrat auf. Es kam zu einem Anstieg der VEGF-Konzentration, welcher nach 24 Stunden Butyrat-Inkubation wieder aufgehoben war. Dieser Anstieg nach 4 Stunden kann mit dem während der Inkubation mit Butyrat auftretenden Stress für die Zellen, ähnlich einer Hypoxie-Episode erklärt werden. Im weiteren Verlauf zeigt sich dann der durch Butyrat verhinderte VEGF-Anstieg. Die Inkubation mit Butyrat stellt für die Zellen eine besondere Belastungssituation dar, da sich

freie Sauerstoffradikale (ROS) bilden und somit der bereits erwähnte Anstieg der VEGF-Expression erklärt werden kann (Giardina, 1999).

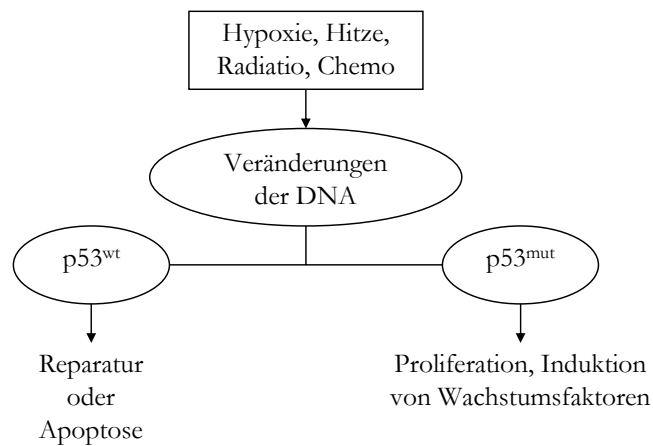
Bezüglich des VEGF-Rezeptors-1 (FLT-1) zeigte die Zelllinien HT29, CX1 und SW480, analog zu VEGF, eine Abnahme der mRNA-Synthese. Die Metastasen-Zelllinie SW620 zeigte nach Inkubation mit Butyrat einen Anstieg der Synthese des VEGF-Rezeptors unabhängig von der applizierten Konzentration.

In der Kontrolle unter Mediumbedingungen zeigte die Zelllinie SW480, im Gegensatz zu HT29, CX1 und SW620 keine Veränderung. Bei der Zelllinie CX1 kam es zu einer Zunahme der Expression des VEGF-Rezeptors-1. Dies deutet auf eine zunehmende Entdifferenzierung der Zellen während der Kultivierung hin.

Nach 2 und 8 Stunden kam es zu einem diskreten Rückgang der FLT1-Expression bei HT29, SW480 und SW620. Dies ist auf die autokrine Stimulation zurückzuführen die als Folge der Präsenz von VEGF erfolgt (Petrova, 1999). Jedoch deutet auch dieses Phänomen auf eine Veränderung des Angiogenese geschehens hin. Im Rahmen einer Verminderung der Rezeptordichte für VEGF ist die auslösende Signalkaskade deutlich verringert und die Geschwindigkeit und Ausprägung der Neovaskularisation gebremst. Im Gegensatz zu den Daten von Wang steigt die Expression von FLT-1 jedoch nicht wieder an, sobald es zu einer Verminderung der VEGF-Konzentration kommt (Wang, 2000).

#### ***4.2 Die Wirkung von Butyrat auf p53***

Das Tumorsuppressor-Gen p53 spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Tumörprävention. Ohne zellulären Stress ist die Anwesenheit von p53 in geringen Konzentrationen konstant und ohne jeden Effekt für das weitere Überleben der Zelle. Unter verschiedenen Stressbedingungen wird allerdings p53 aktiviert. Ein entscheidender Stressor stellt die Hypoxie dar. Das p53- Tumorsuppressor-Gen sorgt in intaktem Zustand für die Elimination veränderter DNA. Dies führt entweder über ein DNA-Reparatursystem zum Erhalt der Zelle oder via Apoptose zum Zelluntergang (Oren, 2003). Eine Mutation im p53-Gen, kann an unterschiedlichen Stellen während der Karzinogenese zur Einstellung der Suppressorfunktion führen. Darüber hinaus führt eine solche Mutation zu einer verstärkten Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, zum Beispiel des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).



**Abb. 10:** Unterschiede des Zellverhaltens abhängig vom Vorliegen einer Mutation im p53-Tumorsuppressor-Gen

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Zellen mit mutiertem Tumorsuppressor-Gen auf Butyrat durch eine Abnahme der p53<sup>mut</sup>-mRNA-Synthese reagieren. Auch die Zelllinie SW620 zeigte nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat in Konzentrationen von 2 mmol einen Abfall der p53<sup>mut</sup>-mRNA-Expression. Die butyratfreie Kontrolle zeigte keine veränderte Expression. In der unbehandelten Kontrolle war die Expression von p53<sup>mut</sup> bei den Zelllinien HT29, SW480 und SW620 bereits auf sehr niedrigem Niveau und zeigte im Verlauf keine Änderungen. Dies erhärtet die Hypothese, dass ohne eine Mutation von p53 in Tumorzellen keine ausreichende Expression von VEGF möglich ist. Diese Suppression kann durch Butyrat erfolgen.

LOVO-Zellen sind ein Beispiel für Zellen mit einem wild-typ p53 (p53<sup>wt</sup>). Kondo et al. transfizierten VEGF in LOVO Kolonkarzinom Zellen. Diese transfizierten Zellen wurden anschließend subkutan in Nacktmäuse transplantiert. Verglichen mit den Kontrollmäusen die ein Transplantat ohne VEGF bekamen zeigten die transfizierten Tumoren ein weit ausgeprägteres Metastasierungsverhalten sowohl für Leber- als auch Peritonealmetastasen (Kondo, 2000). Dies führte zu der Annahme, dass die Fähigkeit zur Metastasierung gegeben ist sobald Zellen in der Lage sind, VEGF über die physiologischen Verhältnisse hinaus zu produzieren. VEGF kann, wie hier gezeigt, durch Butyrat sowohl auf Ebene der m-RNA- und Protein-Synthese gehemmt werden. HT29 Zellen besitzen ein mutiertes Tumorsuppressor-Gen p53. Dies lässt einen guten Vergleich mit Primärtumoren zu, da diese meist eine solche Mutation aufweisen. In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass die

Expressionsminderung von VEGF mit einer reduzierten Expression von p53 zusammenhängt. Linderholm beschrieb dies bereits an Hand des Mammakarzinoms (Linderholm, 2000). p53<sup>wt</sup> unterbindet die Expression von VEGF durch Regulation der Transkriptionsfaktoren Sp1 und führt zu einer Verminderung der Src Kinase Aktivität unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (Pal, 2001). Kieser zeigte, dass eine Mutation im p53 Tumorsuppressor-Gen nötig ist, damit Zellen VEGF exprimieren können (Kieser, 1994). Mutationen im p53 verursachen eine Expressionsregulation des Angiogeneseinhibitors Thrombospadin-1.

Positiv	Negativ
Angiopoetin-1	Thrombospadin 1
bFGF	Interferon $\chi$
IL-1,6 und 8	Löslicher FGF-R
PDGF	Löslicher VEGFR-1
IGF-1	TGF- $\beta$
VEGF A-E	TNF- $\alpha$

**Tab. 6:** Schematische Gegenüberstellung der negativen und positiven Regulatoren der Angiogenese (Auswahl)

Die Gruppe um Emenaker hat entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit gezeigt, dass Butyrat die Expression von p53<sup>mut</sup> inhibiert (Emenaker, 2001). Hierbei wurden vergleichbare Butyrat-Konzentrationen verwendet. Die beobachtete Minderung der p53<sup>mut</sup>-Expression durch Butyrat wäre eine plausible Erklärung für die durch Butyrat vermittelte Verminderung der VEGF-Expression. In früheren Publikationen haben Kieser et al. gezeigt, dass p53<sup>mut</sup> zu einer Erhöhung der VEGF Expression geführt hat (Kieser, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit fiel auf, dass die Zelllinie CX1 unter Mediumbedingungen eine Zunahme der p53<sup>mut</sup>-Expression zeigte. Dies könnte auf eine neu aufgetretene Mutation hindeuten.

### 4.3 Die Verknüpfung zwischen VEGF/FLT-1 und p53

Protektive Effekte bei der Malignitätsentwicklung und die Modulation von Invasivität und Metastasierung sind momentan im Fokus der Forschung. Emenaker et al. zeigten Ergebnisse über die Fähigkeit der kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat die Entwicklung von invasiven Kolonkarzinomen zu verhindern (Emenaker, 2001). Sie zeigten die Verminderung von verschiedenen für den Metastasierungsprozeß wichtigen Faktoren wie Urokinase Plasmin Aktivator und der Matrix-Metallo-Proteinase durch kurzkettige Fettsäuren. Neben der Fähigkeit zur Gewebs- und Gefäßinvasion ist hier für den Metstasierungsprozeß auch die Angiogeneese von entscheidender Bedeutung bei der Filiarisierung.

Die differenzierende Wirkung von Butyrat auf Kolonkarzinomzellen kann mit einer Verringerung der Expression des mutierten p53 zusammenhängen. Eine Mutation dieses Tumorsuppressorgens führt zu einer gesteigerten VEGF-Expression (Kieser, 1994). Die daraufhin ausgebildete Zahl an Blutgefäßen korreliert mit der Expression von VEGF (Takahashi, 1997). Demzufolge könnte im Rahmen des von Butyrat gegebenen Differenzierungsimpulses eine Senkung der Expression von VEGF resultieren. Damit wird nicht nur das Wachstum des Primärtumors gehemmt, sondern zusätzlich auch die im Körper verstreuten Tumorzellen an der Ausbildung von Blutgefäßen und somit an der Metastasiering gehindert.

In diesem Zusammenhang kann auch die verminderte Expression des Rezeptors FLT-1 (VEGFR-1) unter Butyrat erklärt werden. Die Hemmung der Sekretion und somit der autokrinen Stimulation durch VEGF wird zusätzlich durch die Verminderung der Rezeptoren noch verstärkt. Konkruent zur Abnahme der VEGF-mRNA konnte auch auf Proteinebene ein Rückgang der Expression durch einen ELISA nachgewiesen werden.

Es wurde beschrieben, dass durch Transfektion mit intakten p53, Zellen mit ursprünglich vorhandener Mutation erneut eine normale, Expression und Synthese von VEGF aufwiesen (Zhang, 2000). Diese Erkenntnisse haben uns motiviert, ähnliche Versuche mit Zellen durchzuführen, welche diese häufig auftretende Mutation nicht aufwiesen. Die Daten für eine solche Zelllinie mit intaktem p53, hier HCT15 waren nur auf Proteinebene zu erlangen. Wie erwartet, stellte die zu geringe Expression von VEGF-RNA ein Problem der uns zur Verfügung stehenden Methode dar. Die Proteinexpression war, entgegen den Erwartungen, nicht wesentlich von der in HT29 Zellen, welche über eine Mutation im p53 Gen verfügen,

zu unterscheiden. Ob dies damit im Zusammenhang steht, dass durch die lange Kultivierung eine andere Mutation aufgetreten ist, welche über einen anderen Weg die Sekretion von VEGF beeinflusst bzw. zu einer Stabilisierung des Proteins führt, bleibt zu klären.

Allerdings weist Butyrat auch hier den bereits beschriebenen Effekt einer Reduktion der Proteinexpression bzw. Sekretion auf.

Eine interessante Entdeckung während der Versuche war, dass sich zwei Stunden nach Gabe von Butyrat erst eine stärkere Expression von VEGF zeigte als bei der mit Medium inkubierten Kontrolle. Im Verlauf stieg allerdings die Expression der VEGF-mRNA in der Kontrolle weiter an. Im Gegensatz dazu tendierten die mit Butyrat behandelten Zellen zu einer Abnahme der VEGF Expression, welche unter das Niveau der 2h-Mediumkontrolle sank. Somit kann der Effekt von Butyrat nicht nur auf einer Hemmung der Expressionszunahme beruhen. Es muss noch ein weiterer Mechanismus eine Rolle spielen.

Da VEGF in der Zelle unter bestimmten Stresssituationen, wie zum Beispiel bei Hypoxie, gebildet wird, lag die Vermutung nahe, dass sich die Synchronisation mit serumfreiem Medium auf die Produktion von VEGF auswirkte.

Für die Zellen mit der p53-Mutation (HT29) zeigten sich folgende Ergebnisse. Die beobachtete Zunahme der VEGF mRNA in den Mediumkontrollen resultierte nicht in einer Erhöhung der VEGF-Proteinkonzentration. Der Überstand nach 2 und 24 Stunden Inkubation mit zusatzfreiem Medium zeigte eine deutliche Abnahme der VEGF-Proteinsynthese. Erstaunlicherweise zeigte sich nach 4 Stunden eine deutliche Zunahme der VEGF-Expression bei den mit 4mmol Butyrat inkubierten Proben. Diese Proben zeigten allerdings nach 24 Stunden eine deutlich supprimierte Proteinexpression für VEGF. Wie bereits zuvor erwähnt, wird dieser Effekt auf die Stresssituation durch freie Sauerstoffradikale während der Inkubation mit Butyrat zurückzuführen sein (Giardina, 1999).

Bei der Zelllinie HCT15 welche über ein wild-typ p53 Tumorsuppressorgen verfügt zeigte sich nach Inkubation mit Butyrat in Konzentrationen von 2-6mmol nur ein minimaler Abfall der ohnehin im Verhältnis zu HT29 deutlich geringeren VEGF Proteinsynthese. Dies war aber im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht deutlich.



#### 4.4 Ausblick

Es wurde viel unternommen, VEGF- und VEGF-Rezeptor-Antagonisten zu entwickeln. Eine Inaktivierung von VEGF mit neutralisierenden anti-VEGF/VEGFR-Antikörpern oder mittels Tyrosin-Receptor-Kinase (RTK)-Inhibitoren zeigen eine effektive Hemmung der Tumorangiogenese und des Tumorwachstums (Hasan, 2001). Bereits 1995 wurde gezeigt, dass VEGF neutralisierende Antikörper in Mäusen mit „human colon carcinoma xenografts“ zu einer Abnahme des Tumorwachstums und einer Hemmung der Metastasierung führten (Warren, 1995). Am Maus-Modell konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein selektiver Inhibitor des VEGF-Rezeptors-2 (KDR oder auch FLK-1 genannt) zu einer geringeren Letalität an Lebermetastasen führt als bei der unbehandelten Kontrollgruppe (Shaheen, 1999). Auch Witte et al. zeigten, dass ein Antikörper gegen KDR zu einer Blockade der Angiogenese und somit zu einem vermindertem Tumorwachstum führten (Witte, 1998).

Die meisten experimentellen Studien über Tumorangiogenese und antiangiogenetische Therapie verwenden schnell wachsende Tumormodelle. Hierzu werden meist Mäuse mit subkutanen hochproliferativen Tumortransplantaten verwendet. Dies ist sicher in Bezug auf das kolorektale Karzinom übertrieben und eine Analyse des Metastasierungsverhaltens und der eventuell zu erprobenden Therapie schwierig. Geeignet wären dafür eher die Analysen von Vaskularisierungsmarkern wie zum Beispiel VEGF (Zuh, 1991), nachdem bereits von Takahashi durchgeführte in-vivo Studien ergeben haben, dass Patienten mit einem niedrigen Plasma-VEGF-Level eine weit bessere Prognose haben als Patienten mit erhöhten Werten (Takahashi, 1997).

Es wurde gezeigt, dass VEGF neutralisierende Antikörper in Mäusen mit „human colon carcinoma xenografts“ zu einer Abnahme des Tumorwachstums und einer Hemmung der Metastasierung führten (Warren, 1995). Es ist abzusehen, dass die Behandlungsmöglichkeiten sich mehr darauf ausrichten, den Tumor in eine Art Tiefschlaf zu versetzen und die Metastasierung somit zu stoppen. Dies kann unter anderem durch die Hemmung der Angiogenese erzielt werden (Wyke, 2000).

An diese Erkenntnisse hat sich auch die Entwicklung eines VEGF-Antikörpers, Bevacizumab, angelehnt. Aktuell hat es bereits in der Tumorthherapie bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen Anwendung gefunden. Hierbei kommt es zusammen mit einer bereits bewährten Chemotherapie (Irinotecan, 5-Fluorouracil und Leucovorin) zum Einsatz.

In der durchgeführten Phase-III Studie zeigte sich eine Verlängerung des medianen Überlebens von 15,6 auf 20,3 Monate (Hurwitz, 2004). Bei der Verwendung von Bevacizumab spielen sowohl antiangiogenetische Effekte als auch die Sensibilisierung der Tumorzellen auf die ergänzende Chemotherapie eine Rolle. Die Autoren weisen darauf hin, dass die Effekte des VEGF-Antikörpers hauptsächlich auf die Hemmung des Tumorwachstums zurückzuführen sind und nicht auf seine Zytotoxizität. Somit ist diese Therapie nur unterstützender Art, kann jedoch eine zusätzliche Chemotherapie nicht ersetzen.

Die Tatsache, dass Butyrat in der Lage ist, die Expression von VEGF zu inhibieren, deutet darauf hin, dass Butyrat nicht nur in der Malignomprävention eine Rolle spielt. Auch bereits entstandene Tumoren können durch Butyrat noch beeinflusst werden. An diesem Punkt könnte auch eine Behandlungsoption mit Butyrat ansetzen.

## 5 Zusammenfassung

Grundlage dieser Arbeit war es die verschiedenartigen Effekte von Butyrat, unter anderem im Rahmen der Prävention von kolorektalen Karzinomen auf die bereits fortgeschrittenen Formen, zu erweitern. Hierzu erfolgte eine Untersuchung von Angiogenesefaktoren und deren Beeinflussung durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat. Die untersuchten Faktoren umfassten VEGF, als potentes angiogenetisches Agens und dessen zugehörigen Rezeptor FLT-1. Zudem wurde das Tumorsuppressorgen p53, ein wichtiger Modulator der Tumorentstehung und Tumorprogression, mituntersucht.

Ziel war es, die positiven Effekte im Rahmen der Prävention auf die metastasierten kolorektalen Karzinome bzw. derer Zelllinien aufzuzeigen.

Die verwendeten Methoden stützten sich einerseits auf die Analyse der mRNA und der Proteine. Hierfür wurden die Zellkultur, die RNA-Isolation, ein RNase Protection Essay (RPA), der Westernblot und ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt.

Die Analysen zeigten einen positiven Effekt auf die Supprimierbarkeit des Wachstumsfaktors VEGF und dessen Rezeptor FLT-1, sowie auch auf das Tumorsuppressorgen p53<sup>mut</sup> in seiner mutierten Variante. Butyrat senkte somit die Expression von VEGF und FLT-1 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Bezüglich der Expression von p53 konnte gezeigt werden, dass die RNA-Expression durch Butyrat ebenfalls eine Hemmung erfuhr.

Ein weiteres Ergebnis der Arbeit bestand darin, den Stress, welcher sowohl die Zugabe von Butyrat als auch eine Episode mit Serumentzug auf das Verhalten des Wachstumsfaktors VEGF hatte. Hierbei zeigte sich eine sehr rasche Zunahme der Expression. Diese normalisierte sich im weiteren Verlauf und hatte somit keinen längerfristigen Einfluß auf die Ergebnisse.

Zusammenfassend zeigt sich eine deutliche Beeinflussung der Angiogenese durch Butyrat, welche auch auf dem Hintergrund der aktuellen Studienlage bezüglich VEGF Antikörpern einen adjuvanten Behandlungsweg darstellen könnte. Kritisch anzumerken bleiben die Probleme der Applikation von Butyrat.

## 6 Anhang

### 6.1 *Abbildungsverzeichnis*

**Abb. 1:** Adenom-Karzinom-Sequenz mit Ort der Ausschaltung bestimmter Tumorsuppressor-Gene

**Abb. 2:** Amsterdam-Kriterien für die hereditäre Form des Non-Polyposis-Kolorektalen Karzinoms (HNPCC) (Zusammenfassung der Amsterdam I und Amsterdam II Kriterien)

**Abb. 3:** HT29 Zellen nach Inkubation mit 4 und 5 mmol Butyrat über 24 Stunden.

**Abb. 4:** CX1 Zellen nach Inkubation mit 4 mmol Butyrat über 24 Stunden.

**Abb. 5:** SW480 Zellen nach Inkubation mit 2 und 6 mM Butyrat über 24. Die Differenzierung zwischen FAF10 und bcl-2 ist nicht möglich. Bei diesem Blot wurde erstmals andeutungsweise VEGF-C sichtbar, jedoch ist eine Aussage diesbezüglich nicht zu treffen.

**Abb. 6:** SW620 Zellen nach Inkubation mit 4 bzw. 5 mmol Butyrat über 24 und 48 Stunden.

**Abb. 7:** VEGF Konzentrationen von HT29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat 2 und 4 mmol nach 24 und 48 Stunden

**Abb. 8:** VEGF Konzentrationen von HT29 Zellen nach Vorinkubation mit Medium bzw. Butyrat in Konzentrationen von 4mmol über 2, 4, und 24 Stunden ohne gleichzeitige Supplementation von FBS über 0, 2, 4, 24 und 48 Stunden. Bezüglich der Fehlenden Serum-Supplementation ist der 0 Stunden-Wert hier nicht dargestellt. Er zeigte jedoch kein Unterschied zum 2 h-Wert.

**Abb. 9:** VEGF Konzentrationen von HCT15 Zellen nach Inkubation mit Butyrat 2 und 4 mmol nach 24 und 48 Stunden

**Abb. 10:** Unterschiede des Zellverhaltens abhängig vom Vorliegen einer Mutation im p53-Tumorsuppressor-Gen

## 6.2 Tabellenverzeichnis

**Tab. 1:** Das Butyrat-Paradoxon (nach Gibson et al. 1999). Dargestellt wurden die Effekte von Butyrat auf physiologische und dysplastisch veränderte Kolonozyten. Die mit “?” markierte Angabe ist bislang nur vermutet, jedoch nicht bestätigt.

**Tab. 2:** Die VEGF-Familie und die zugehörigen Rezeptoren

**Tab. 3:** Verwendete Zelllinien deren Herkunftsorte und Medien

**Tab. 4:** h-Custom Template Set Faktoren

**Tab. 5:** Zusammenfassung der Veränderungen auf RNA-Ebene bei Inkubation mit Butyrat. (a)Mediumkontrolle, (b) Nach Inkubation mit Butyrat

**Tab. 6:** Schematische Gegenüberstellung der negativen und positiven Regulatoren der Angiogenese (Auswahl)

## 6.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Ak	Antikörper
APC	Adenomatosis Poliposis Coli
Bcl-2	Apoptose-Regulationsgen
bFGF	basic fibroblastic growth factor
BSA	Bovines Serum Albumin
But	Butyrat
c-myc	Protoonkogen
CO <sub>2</sub>	Kohlen-Dioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modifide Eagel Medium
DPEC	Diethyl Pyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol

DUKE-Klassifikation	Stadieneinteilung Kolorektaler Karzinome
EDTA	Ethylenediaminetetraaceticacid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Essay
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblastic Growth Factor
FGF10	Fibroblastic Growth Factor 10
FLK-1	fetal liver kinase-1
FLT-1	fms-like Tyrosin Kinase-1
FLT-4	fms-like Tyrosin Kinase-4
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GIT	Gastrointestinal Trakt
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeazetylierung
HIF-1 $\alpha$	Transkriptionsfaktor
HNPCC	Heritary-Non-Polyposis-Cancer
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGF-1	Insulin-like Growth Faktor
IGF-2-R	Insulin-like Growth Faktor –2-Rezeptor
IL	Interleukin
kD	Kilo-Dalton
KDR	Kinase Insert Domain-containing Rezeptor
kg	Kilogramm
k-RAS	Protoonkogen
l	Liter
L32	ribosomales Protein
LOVO	Kolonkarzinom-Zelllinie
mA	Milliampere
Med	Medium
MEM	Medium Essential Medium
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mmol	Millimol
MMR	DNA-Mismatch-Reparatursystems
mRNA	messenger RNA
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	sodium orthovanadate
NEAA	Non Essential Amino Acids
NFκB	Transkriptionsfaktor
nm	Nanometer
p53	Tumorsuppressergen
p53 <sup>mut</sup>	mutiertes p53
p53 <sup>wt</sup>	wild-typ p53
PAR	Protease Activated Receptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pg	Pikogramm
PGF	Placental Growth Factor
PIGF	Placental Growth Factor
PMSF	Phenylmethylsufonylfluorid
RNA	Ribonuclein Säure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	RNase Protection Assay
RTK	Tyrosin-Receptor-Kinase
SCFA	Short chained fatty acids, kurzkettige Fettsäuren
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate- Polyacrylamidgelelektrophoresis

---

Sec	Sekunde
TBE	Tris-Borsäure- Ethylenediaminetetraaceticacid
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine
TSA	Histondeazetylasehemmstoff (R-)Trichostatin A
U	Rounds per minute (rpm)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-A/-B/-C/-D/-E	Vascular Endothelial Growth Factor-A/-B/-C/-D/-E
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
VEGFR-1/-2/-3	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1/-2/-3
VEPF	Vascular Endothelial Permeability Factor
VPF	Vascular Permeability Factor
Σ	Summe



## 7 Literaturverzeichnis

**Alon T**, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E; *VEGF acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity*. Nat Med, 1995; 1(10): 1024-8.

**Arts J**, Lansink M, Grimbergen J, Toet KH, Kooistra T; *Stimulation of tissue-type plasminogen activator gene expression by sodium butyrate and trichostatin A in human endothelial cells involves histone acetylation*. Biochem J, 1995; 310: 171-176.

**Atkin NB**; *Microsatellite instability*. Cytogenet Cell Genet, 2001; 92(3-4): 177-81.

**Bernard JA**, Warwick G; *Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells*. Cell Growth Differ, 1993; 4: 495-501.

**Bodmer WF**, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P et al; *Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5*. Nature, 1987; 328: 614-6.

**Boffa LC**, Lupton JR, Mariani MR, Ceppi M, Newmark HL, Scalmati A, Lipkin M; *Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats*. Cancer Res, 1992; 52(21): 5906-12.

**Bossi P**, Viale G, Lee AK, Alfano R, Coggi G, Bosari S; *Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations*. Cancer Res, 1995; 55: 5049-5053.

**Cancilla B**, Ford.Perriss MD, Bertram JF; *Expression and localization of fibroblastic growth factors and fibroblastic growth factor receptors in the developing kidney*. Kidney Int, 1999; 56(6): 2025-39.

**Cao Y**, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance SG, O'Reilly MS, Llinas M, Folkman J; *Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells*. J Biol Chem, 1996; 271(46): 29461-7.

**Clausen MR**; *Butyrate and colorectal cancer in animals and in humans*. Eur J Cancer Prev, 1995; 4: 483-490.

**Cummings JH**, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT; *Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood*. Gut, 1987; 28: 1221-1227.

**Dvorak TF**; *Tumors: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986; 315: 1650-1658.

**Emenaker NJ**, Calaf GM, Cox D, Basson MD, Qureshi N; *Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, Mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model*. J Nutr, 2001; 131(11 Suppl): 3041S-6S.

**Etoh T**, Shibuta K, Barnard GF, Kitano S, Mori M; *Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration*. Clin Cancer Res 2000; 6(9): 3545-51.

**Fearnhead NS**, Wilding JL, Bodmer WF; *Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis*. Br Med Bull, 2002; 64: 27-43.

**Ferrara N**, Davis-Smyth T; *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997; 120: 871-878.

**Ferrara N**, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW; *The vascular endothelial growth factor family of polypeptides*. J Cell Biochem, 1991; 47(3): 211-8.

**Ferrara N**; *The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis*. Breast Cancer Res Treat, 1995; 36(2): 127-37.

**Giardina C**, Boulares H, Inan MS; *NSAIDs and butyrate sensitize a human colorectal cancer cell line to TNF-alpha and Fas ligation: the role of reactive oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 1999, 1448(3): 425-38.

**Giardiello FM**, Brensinger JD, Petersen GM; *AGA Technical Review on Hereditary Colorectal Cancer and Genetic Testing*. Gastroenterology, 2001; 121: 198-213.

**Gibson PR**, Rosella O, Wilson AJ, Mariadason JM, Rickard K, Byron K, Barkla DH; *Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate*. Carcinogenesis, 1999. 20(4): p. 539-44.

**Hanahan D.**, Folkman J; *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996; 86: 353-364.

**Hasan J**, Jayson GC; *VEGF antagonists*. Expert Opin Biol Ther, 2001; 1(4): 703-18.

**Hill MJ**; *Bacterial fermentation of complex carbohydrate in the human colon*. Eur J Cancer Prev, 1995; 4: 353-358.

**Holmgren L** O'Reilly MS, Folkman J; *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. Nat Med, 1995; 1: 149-153.

**Houck KA**, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW; *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA*. Mol Endocrinol, 1991; 5(12): 1806-14.

**Hurwitz H**, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F; *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004 3; 350(23): 2335-42.

**IARC** Cancer Base, Lyon, 2001.

**Josko J**, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S; *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis*. Med Sci Monit, 2000; 6(5): 1047-52.

**Kashtan H**, Stern HS, Jenkins DJ, Jenkins AL, Thompson LU, Hay K, Marcon N, Minkin S, Bruce WR; *Colonic fermentation and markers of colorectal-cancer risk*. Am J Clin Nutr, 1992; 55: 723-728.

**Kieser A**, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W; *Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression*. Oncogene, 1994; 9(3): 963-9.

**Kim** YI; *Vegetables, fruits, and colorectal cancer risk: what should we believe?* Nutr Rev, 2001; 59(12): 394-8.

**Kinzler** KW, Vogelstein B; *Lessons from hereditary colorectal cancer.* Cell, 1996; 87: 159-170.

**Kondo** Y, Arii S, Furutani M, Isigami S, Mori A, Onodera H, Chiba T, Imamura M; *Implication of Vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in non-invasive colorectal carcinoma.* Cancer, 2000; 88(8): 1820-7.

**Kong** W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Böhm SK, Bunnett NW; *Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2.* Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 8884-8889.

**Kritchevsky** D; *Epidemiology of fiber, resistant starch and colorectal cancer.* Eur J Cancer Prev, 1995; 4: 345-52.

**Kruh** J; *Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent on cells in culture.* Mol Cell Biochem, 1982; 42: 65-82.

**Kwiatkowska** K., Sobota A; *Signaling pathways in phagocytosis.* Bioessays, 1999; 21: 422-431.

**Leung** DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N; *Vascular endothelial Growth Factor is a secreted angiogenic mitogen.* Science, 1989; 246(4935): 1306-9.

**Levine** A, Momand J, Finlay CA; *The p53 tumour suppressor gene.* Nature, 1991; 351: 453-456.

**Linderholm** B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R; *Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment.* J Clin Oncol, 2000; 18(7): 1423-31.

**Luhrs** H, Gerke T, Boxberger F, Backhaus K, Melcher R, Scheppach W, Menzel T; *Butyrate inhibits interleukin-1-mediated nuclear factor-kappa B activation in human epithelial cells.* Dig Dis Sci, 2001; 46(9): 1968-73.

- Luhrs H**, Hock R, Schaubert J, Weihrauch M, Harrer M, Melcher R, Scheppach W, Bustin M, Menzel T; *Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells*. *Int J Cancer*, 2002; 97(5): 567-73.
- Lynch HT**, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR; *Genetics, natural History, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 1993; 104: 1535-1549.
- Michele Maio**, Maresa Altomonte, Luana Calabrò, Ester Fonsatti; *Bioimmunotherapeutic targets on angiogenic blood vessels in solid malignancies*. *Frontiers in Bioscience*, 2001, 6: d776-784.
- McLaren J**; *Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis*. *Hum Reprod Update*, 2000; 6(1): 45-55.
- Melder RJ**, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK; *During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium*. *Nat Med*, 1996; 2(9): 992-7.
- Minagawa N**, Nakayama Y, Hirata K, Onitsuka K, Inoue Y, Nagata N, Itoh H; *Correlation of plasma level and immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in patients with advanced colorectal cancer*. *Anticancer Res*, 2002; 22(5): 2957-63.
- Mukhopadhyay D**, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, Sukhatme VP; *Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation*. *Nature*. 1995; 375(6532): 577-81.
- Oren**; *Decision making by p53: life, death and cancer*. *Cell Death Differ*, 2003; 10(4): 431-42.
- Pal S**, Datta K, Mukhopadhyay D; *Central role of p53 on Regulation of Vascular permeability factor/ Vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma*. *Cancer Research*, 2001; 61: 6952-57.
- Petrova TV**, Makinen T, Alitalo K; *Signaling via VEGF- Receptors*. *Experimental Cell Res*, 1999; 253: 117-130.

**Pili R**, Kruszewski MP, Hager BW, Lantz J, Carducci MA; *Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis*. Cancer Res, 2001; 61(4): 1477-85.

**Poole TJ**, Finkelstein EB, Cox CM; *The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development*. Dev Dyn, 2001; 220(1): 1-17.

**Potter JD**; *Colorectal Cancer: molecules and populations*. J Natl Cancer Inst, 1999; 91: 916-932.

**Quinn TP**, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT; *Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90(16): 7533-7.

**Redston M**; *Carcinogenesis in the GI tract: from morphology to genetics and back again*. Mod Pathol, 2001; 14(3): 236-45.

**Robbins**; *Pathologic Basis of disease*. 6th Edition, 1999, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, USA.

**Roberts WG**, Palade G; *Increased microvascular Permeability and endothelial fenestration induced by VEGF*. J Cell Sci, 1995; 103: 2369-2379.

**Saclarides TJ**, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB; *Tumor angiogenesis and rectal carcinoma*. Dis Colon Rectum, 1994; 37(9): 921-6.

**Salahshor S**, Kressner U, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G, Lindblom A; *Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes*. Genes Chrom Cancer, 1999; 26: 247-252.

**Scheppach W**, Fabian C, Sachs M, Kasper H; *The effects of starch malabsorption on fecal short-chain fatty acids excretion in man*. Scand J Gastroenterol, 1988; 23: 755-759.

**Scheppach W**, Melcher R, Luhrs H, Menzel T; *Primary prevention of sporadic colorectal carcinoma by diet modification and drugs?* Internist (Berl), 2000; 41: 868-875.

**Scheppach W**; *Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function*. Gut, 1994; 35 S1: S35-8.

- Senger DR**, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF; *A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines*. *Cancer Res*, 1986; 46: 5629-5632.
- Shaheen RM**, Davis DW, Liu W, Zebrowski BK, Wilson MR, Bucana CD, McConkey DJ, McMahon G, Ellis LM; *Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis*. *Cancer Res*, 1999; 59: 5412-5416.
- Sharlow ER**, Paine CS, Babiarz L, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M; *The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis*. *J Cell Science*, 2000; 113: 3093-3101.
- Sunderkotter C**, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C; *Macrophages and angiogenesis*. *J Leukoc Biol*, 1994; 55(3): 410-22.
- Takahashi Y**, Tucker SL, Kitadai Y, Koura AN, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM; *Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer*. *Arch Surg*, 1997; 132: 541-6.
- Takahashi Y**, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM; *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer*. *Cancer Res*, 1995; 55: 3964-3968.
- Terman BI**, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB; *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase*. *Oncogene*, 1991; 6(9): 1677-83.
- Tokunaga T**, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M; *Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer*. *Br J Cancer*, 1998; 77(6): 998-1002.
- Torimura T**, Sata M, Ueno T, Kin M, Tsuji R, Suzaku K, Hashimoto O, Sugawara H, Tanikawa K; *Increased expression of vascular endothelial growth factor is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma*. *Hum Pathol*, 1998; 359: 845-848.
- Tsujii M**, DuBois RN; *Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthetase 2*. *Cell*, 1995; 83: 493-501.

- Velazquez OC, Jabbar A, DeMatteo RP, Rombeau JL;** *Butyrate inhibits seeding and growth of colorectal metastases to the liver in mice.* Surgery, 1996; 120(2): 440-8.
- Vogelstein B, Fearnton ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL;** *Genetic alterations during colorectal-tumor development.* N Engl J Med, 1988; 319: 525-532.
- Wang D, Donner DB, Warren RS;** *Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF.* J Biol Chem, 2000; 275(21): 15905-11.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB;** *Induction of Vascular endothelial growth factor by Insulin-like Growth factor 1 in coloractal carcinoma.* Jour Biol Chemistry, 1996; 271, 46: 29483-8.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N;** *Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis.* J Clin Invest, 1995; 95: 1789-97.
- Werther K, Christensen IJ, Brunner N, Nielsen HJ;** *Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma.* Eur J Surg Oncol, 2000; 26 (7): 657-662.
- Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, Pytowski B, Kotanides H, Rockwell P, Bohlen P;** *Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy.* Cancer Metastasis Rev 1998; 17: 155-61.
- Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP;** *Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stages of colorectal tumor progression.* Int J Cancer, 1999; 81: 845-850.
- Wyke JA;** *Overview-burgeoning promise in metastasis research.* Eur.J.Cancer, 2000,36: 1589-1594.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T;** *Potent and specific inhibition of mammalian deacetylase both in vivo and in vitro by Trichostatine A.* J Biol Chem, 1990; 265: 17174-9



**Zgouras D**, Wachtershauser A, Frings D, Stein J; *Butyrate impairs intestinal tumor cell-induced angiogenesis by inhibiting HIF-1 alpha nuclear translocation*. Biochem Biophys Res Commun 2003, 24; 300(4): 832-8.

**Zhang L**, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM, Pollock RE et al; *Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression*. Cancer Res, 2000; 60(13): 3655-3661.

**Zhu DZ**, Pauli BU; *Generation of monoclonal Antibodies directed against organ-specific endothelial cell surface determinants*. J Histochem Cytochem, 1991; 39: 1137-42.

Meinen Eltern gewidmet

## Gwendolin Etzrodt-Walter

### PERSÖNLICHE DATEN

---

- Geboren am 10.05.1976 in Laupheim
- Verheiratet mit Dr. med. Sven Walter
  - Sohn Linus geboren am 13. Februar 2002

### AUSBILDUNG

---

- 1986 - 1992      Illertal - Gymnasium Vöhringen
- 1992 - 1993      Dana Hall High School, Wellesley Mass. USA
- Auslandsschuljahr in der 11. Klasse
- 1993 - 1996      Lessing-Gymnasium Neu-Ulm
- Abschluss des Gymnasiums mit der allgemeinen Hochschulreife
- 1996-2003      Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius – Maximilians Universität Würzburg und an der Universität Ulm
- Sept. 1998      Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
  - Sept. 1999      1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
  - März 2002      2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
  - April 2003      3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- Aug. 2003      Beginn der Facharztausbildung an der Universität Ulm  
Abteilung Innere Medizin 1 (Gastroenterologie und Endokrinologie)

### SPRACHKENNTNISSE

---

Deutsch: Muttersprache, zweisprachig aufgewachsen

Französisch: Muttersprache, zweisprachig aufgewachsen

Englisch: fließend in Schrift und Sprache

Italienisch: Grundkenntnisse

- 1992-1993:      Auslandsaufenthalt Wellesley, Mass., USA.
- August 1995:    Teilnahme an einem einmonatigen Französisch – Intensivkurs an der Universität Bordeaux, Frankreich
- März/April 1999 Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des Brigham and Women's Hospital der Harvard University in Boston, Mass., USA

## DISSERTATION

---

Seit 2000      Doktorarbeit in der gastroenterologischen  
Schwerpunkt Abteilung der medizinischen  
Universitätsklinik Würzburg  
Thema der Dissertation: Regulation von Faktoren der  
Angiogenese durch die Kurzkettige Fettsäure Butyrat  
beim kolorektalen Karzinom

## ABSTRACTS, POSTER UND VORTRÄGE

---

1. Oktober 2000, Referentin im Rahmen des Endokrinologisch-gastroenterologischen Kolloquiums der Universität Würzburg
2. November 2000, Abstract und Vortrag auf dem internationalen Symposium „Nutrition and Oncology“ in Frankfurt am Main
3. Februar 2001, Abstract und Posterpräsentation auf der 2. Bad Brückenauer Herbsttagung der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg
4. April 2001, Abstract und Posterpräsentation auf dem Spring-meeting des EORTC-GITCCG in Ulm
5. September 2001, Abstract und Posterpräsentation auf dem 23. ESPEN Congress in München

## BESONDERE INTERESSEN

---

Sport: Skifahren, Fitness, Radfahren, Segeln  
Special Olympics Instructor