

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

VERSTÄRKUNG BUTYRAT INDUZIERTER APOPTOSE
IN KOLOREKTALEN KARZINOMZELLEN
DURCH ASPIRIN UND TUMOR NEKROSE FAKTOR α

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Theodor Kudlich
aus Kemnath

Würzburg, Mai 2003

Referent: Professor Dr. med. Wolfgang Scheppach

Koreferent: Professor Dr. med. Wolfgang Timmermann

Dekan: Professor Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2003

Der Promovend ist Arzt.

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1 Zellkultur	9
2.2 Apoptosebestimmung durch eine Annexin V –Propidiumjodid – Doppelfärbung	11
2.3 Annexin V – Propidiumjodid – Färbung und FACS-Analyse	14
2.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay	16
2.5 RNA-Isolation und RNase protection Assay	17
2.5.1 RNA-Isolation mit RNeasy Mini Kit	17
2.5.2 RNase Protection Assay (RPA)	19
3. Ergebnisse	22
3.1 Apoptoseinduktion durch Aspirin und Butyrat an HT-29 Zellen	22
3.1.1 Apoptoseinduktion durch Aspirin	22
3.1.2 Apoptoseinduktion durch Butyrat	27
3.1.3 Apoptoseinduktion durch eine Kombination von Aspirin und Butyrat	31
3.1.4 Vergleich der Apoptoseinduktion durch Aspirin und Butyrat gegenüber den Einzelsubstanzen	35
3.2 Vergleich der apoptotischen Wirkung von Butyrat und TNF α mit einer Kombination der Einzelsubstanzen an HT-29 Zellen	39
3.3 Vergleich der apoptotischen Wirkung von Butyrat und TNF α mit einer Kombination der Einzelsubstanzen an SW620 Zellen	45
3.4 EMSA und Supershift zur Überprüfung der NF- κ B – Aktivierung durch TNF α unter Butyrateinfluß	50
3.5 RPA zur Prüfung der Modulation NF- κ B – abhängiger antiapoptotischer Faktoren durch Butyrat	53
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis	67

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom war im Jahre 2000 der dritthäufigste Tumor weltweit [1, 2], in der Europäischen Union hat es bereits 1999 das Bronchial- und das Mammakarzinom an Häufigkeit übertroffen [3]. Bei ca. der Hälfte aller Menschen in Bereich der Industriestaaten entwickelt sich eine gutartige Neoplasie im Bereich von Kolon und Rektum, die bei ca. 10% der Betroffenen maligne entartet [4]. Als Entstehungsweg der Karzinogenese wird heute – zumindest für das sporadische Kolonkarzinom – die Adenom–Karzinom–Sequenz nach Kinzler und Vogelstein [4] betrachtet. Danach kommt es zu maligner Entartung eines primär benignen Adenoms infolge mehrerer Mutationen. Das Erkrankungsrisiko ist bis zum Alter von 50 Jahren zwar verhältnismäßig gering, steigt aber danach deutlich an [5]. Das relative Risiko einer Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom liegt für Frauen mit ca. 5,9% leicht niedriger als für Männer mit 6,1% [5]. Neben dem sporadischen kolorektalen Karzinom gibt es auch hereditäre Formen wie HNPCC oder Karzinome bei familiärer Polyposis coli und Karzinome als Folge einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung [6].

In ihrem Reifungsprozeß wandern die Epithelzellen des Kolons von der Basis der Krypten in Richtung Lumen. Im Rahmen dieser Wanderung verlieren die Zellen allmählich ihre Regenerationsfähigkeit und differenzieren endgültig aus. Proliferierende, Ki-67 positive Stammzellen finden sich in normaler Schleimhaut lediglich am Boden der Krypten [7], auch die Aktivität der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) nimmt bereits zur Hälfte der Krypte hin deutlich ab [7]. Im Rahmen dieser Wanderung von der Basis der Krypten zum Lumen altern die Zellen, gehen in Apoptose und lösen sich ins Lumen ab.

Ähnlich wie bei anderen Formen maligner Neoplasien ist beim kolorektalen Karzinom das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod gestört, ebenso findet sich häufig ein Verlust des Differenzierungsgrades. Zur Prävention des kolorektalen Karzinoms wäre es also von Interesse, einfache Maßnahmen, e.g. im Bereich der Ernährung, zu finden, mit denen die Differenzierung der Kolonozyten und damit nachfolgend auch der Zellumsatz im Sinne einer gesteigerten Apoptose gefördert

werden könnte, i.e. das natürliche Gleichgewicht zwischen Zunahme der Zellzahl durch Proliferation und Abnahme durch Apoptose wird unterstützt.

Epidemiologische Studien weisen auf eine bedeutende Rolle der Ernährung bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms hin [5]. Dieser nutritive Einfluß ist naheliegend, da die Kolonozyten dem Inhalt des Kolons und damit zahlreichen beeinflussenden Faktoren, die mit der Nahrung aufgenommen werden oder aus dieser im Verdauungstrakt entstehen, ausgesetzt sind.

Kennzeichnend für eine Ernährung, die für eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit an malignen kolorektalen Neoplasien prädisponiert, ist ein Mangel an Ballaststoffen [8], i.e. Ballaststoffe haben einen protektiven Effekt gegenüber dem Kolonkarzinom. In das Kolon gelangte Ballaststoffe sorgen für ein erhöhtes Stuhlvolumen und eine beschleunigte intestinale Transitzeit, wodurch Expositionszeit und –menge potentieller Karzinogene verringert werden. Zusätzlich kommt es zu weiteren positiven Auswirkungen wie pH-Verringerung und Modifikation der physiologischen Darmflora und des Gallensäuremetabolismus, worüber eine verbesserte Karzinogenausscheidung ermöglicht wird [9]. Einen essentiellen Bestandteil der Ballaststoffe stellen die Kohlenhydrate dar, die von den Enzymen des menschlichen Darmes nicht verdaut werden können und so im Rahmen ihrer Passage ins Kolon gelangen. Dort sind anaerobe Bakterien in der Lage, diese Kohlenhydrate zu fermentieren. Zu den Produkten dieser Fermentation gehören unter anderem die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat mit einer Mindestmenge von 300mMol/d in einem Verhältnis 57% zu 22% zu 21% [10].

Besondere Bedeutung hat hier Butyrat, das von den Kolonozyten aufgenommen und, gegenüber Glucose und Glutamin bevorzugt, als Energielieferant verstoffwechselt wird [11]. Aus einem Mangel an Butyrat resultieren Mucosaatrophie und nachfolgende Entzündung der Schleimhaut, nicht unähnlich einer Colitis ulcerosa [12, 13]. Folge einer Entzündung, vor allem einer chronischen Entzündung, kann die Ausbildung von Dysplasien sein. Kommt es zur Ausbildung von Dysplasien, steigt das Risiko der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms [6]. In normaler Mucosa sorgt Butyrat für Wachstum und Überleben der Kolonozyten [14, 15]. Während Butyrat also auf normale Kolonozyten proliferationsfördernd wirkt, bewirkt es in neoplastisch veränderten

Epithelzellen eine Reduktion des Wachstums und hemmt die präneoplastische Hyperproliferation *in vitro*, die durch verschiedene Tumorpromotoren induziert wird [16, 17].

Inkubiert man verschiedene Karzinomzelllinien des Kolons mit Butyrat in physiologischer Konzentrationen *in vitro*, kommt es zu einer Inhibition der Proliferation und einer Steigerung der Differenzierung in der Zellpopulation [18-20]. Ein weiterer Effekt von Butyrat ist, neben einer Modulation der Adhäsionsmoleküle [21], die Induktion von Apoptose [21-28], wobei die Differenzierung der Apoptoseinduktion offenbar vorausgeht [28-31]. Die Relevanz dieser mit der Tumorgenese verknüpften Effekte wird sowohl durch Tiermodelle [9, 32] verdeutlicht, als auch durch Untersuchungen an Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen, deren fäkale Butyratspiegel deutlich erniedrigt waren [33].

Die unterschiedlichen hier dargestellten Aspekte von Butyrat werden unter dem Begriff Butyrat-Paradoxon [34] zusammengefaßt: Hauptenergieträger und Wachstumsstimulator normaler Kolonschleimhaut auf der einen Seite, Proliferationshemmer und Förderer von Apoptose und Differenzierung kolorektaler Karzinomzellen *in vitro* auf der anderen. Damit ist Butyrat durchaus als ein Inhibitor kolorektaler Karzinogenese [25] anzusehen.

Auf welchen molekularen Grundlagen diese paradoxen Effekte von Butyrat beruhen, ist bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Ansatzpunkte sind Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 [35-37], Aktivierung und Inaktivierung verschiedener stressaktivierter Kinasen wie p38, JNK oder ERK [38] und – evtl. damit verbunden – Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B [26, 39], C-fos [40] oder C-myb [41].

Epidemiologische Studien zeigten, ähnlich der präventiven Wirkung einer gesunden Ernährung, auch eine chemoprotektive Wirkung von Acetylsalicylsäure (Aspirin) gegenüber kolorektalen Neoplasien. Es reduziert sowohl die Entstehung adenomatöser [42] als auch karzinomatöser Neoplasien im Bereich von Kolon und Rektum [43-46], allerdings sind derartige protektive Effekte erst nach langjähriger und regelmäßiger Einnahme zu beobachten [47]. Die genaue Tagesdosis, die für diesen protektiven Effekt notwendig wäre, liegt zwischen 80mg und 325mg [47, 48]. Das Problem potentieller

Nebenwirkungen wie Ulcera, gastrointestinale Blutungen oder C-Gastritis zwingt dazu, die Dosis möglichst niedrig zu halten [49]. Protektive Effekte konnten auch durch andere nichtsteroidale Antiphlogistika wie Sulindac [50, 51] oder Piroxicam [52] hervorgerufen werden. Die protektiven Effekte des Aspirins zeigten sich auch im Tiermodell, sowohl für spontane intestinale Neoplasien bei im APC-Gen defekten Mäusen [53] als auch für chemisch induzierte [54, 55] Karzinogenese. In vitro inhibiert Aspirin die Proliferation kolorektaler Karzinomzellen und induziert Apoptose [56-60]. Ob nun diese protektiven Effekte nichtsteroidaler Antiphlogistika durch Inhibition von Cyclooxygenase-1 bzw. -2 oder durch cyclooxygenaseunabhängige Signalwege vermittelt werden, steht noch nicht fest. Für die Beteiligung der Cyclooxygenasen sprechen die in kolorektalen Tumoren erhöhten Prostaglandinspiegel [61, 62], der dort erhöhte Cyclooxygenase-2-Level [63] und die Tatsache, daß sich viele Effekte in vitro auch durch spezifische Hemmung der Cyclooxygenase-2 ergeben [24]. Gegen den durch Cyclooxygenasen vermittelten Weg spricht zum einen die Tatsache, daß Sulindac-Sulfon ebenfalls proliferationshemmend und apoptoseinduzierend wirkt, ohne Cyclooxygenasen zu inhibieren [64, 65], zum anderen die Tatsache, daß spezifische Hemmer der Cyclooxygenase-2 Apoptose in Zellen induzieren, die keine Cyclooxygenasen exprimieren [66]. Auch wird die Apoptose durch nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) nicht dadurch verhindert, daß die fehlenden Produkte des Cyclooxygenasestoffwechsels zeitgleich mit den NSAID zugegeben werden.

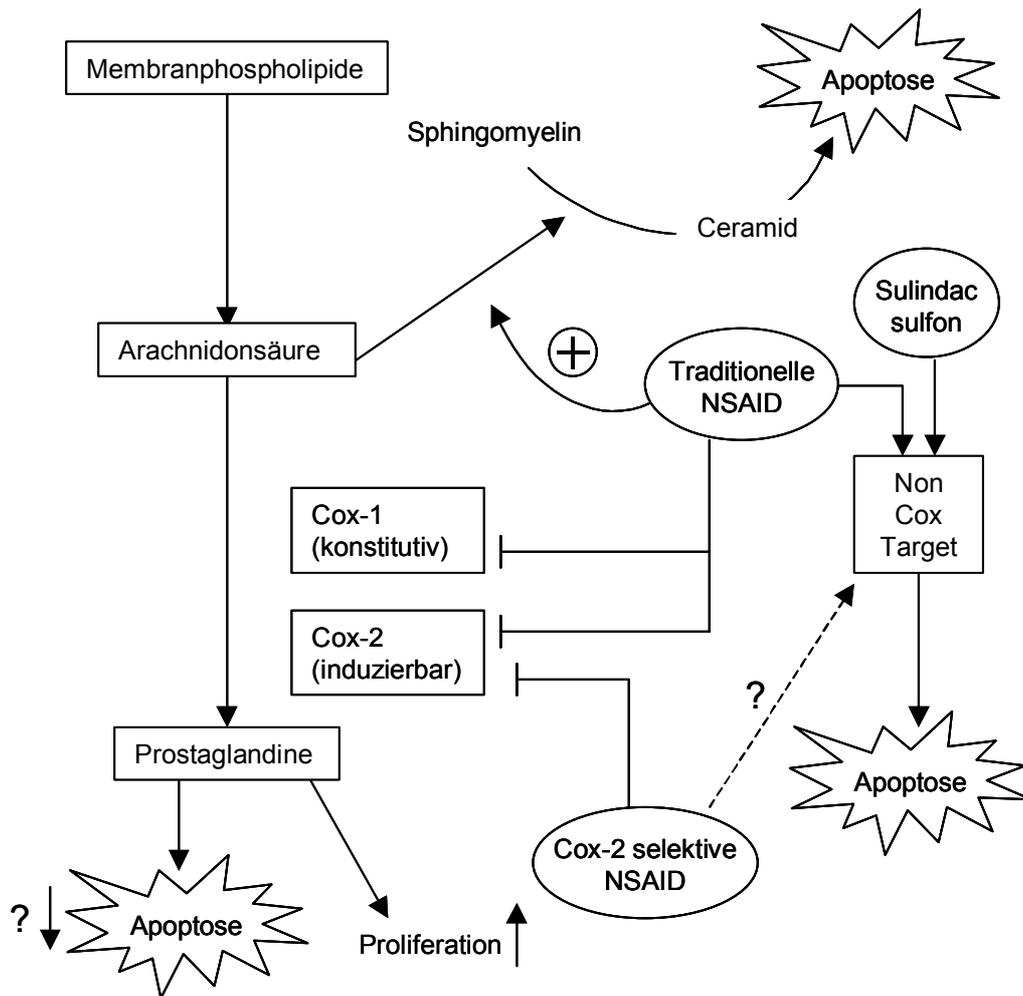


Abbildung 1: Ansatzpunkte der NSAID (nach Elder [67], 1999). Sowohl traditionelle als auch COX-2-selektive NSAID hemmen über Inhibition der Prostaglandinsynthese die Zellproliferation. Nichtselektive NSAID unterstützen zudem indirekt die Apoptoseinduktion über eine Sphingomyelin-Ceramid-Signalkaskade. Außerdem wirken nichtselektive NSAID wohl ähnlich wie Sulindac-Sulfon auch auf Signalwege, die nicht am Cyclooxygenaseweg beteiligt sind. Inwieweit auch COX-2-selektive NSAID hier wirken, ist bislang noch unklar.

Butyrat wie auch NSAID haben also sehr differenzierte Auswirkungen auf Proliferationsverhalten, Differenzierung und Apoptose kolorektaler Epithelzellen, sowohl in vitro als auch in vivo. Der Nachteil einer Untersuchung in vitro ist allerdings die Tatsache, daß die Zellpopulation kein Bestandteil des menschlichen Körpers mehr ist und so Einflüssen anderer körpereigener Regelsysteme wie dem Immunsystem entzogen wird. Die Wechselwirkungen zwischen diesen einzelnen Komponenten werden unter anderem durch körpereigene Botenstoffe wie Hormone und Zytokine vermittelt. Betrachtet man nun speziell bei Butyrat die Einflüsse auf Kolonozyten, also sowohl seine antiinflammatorische Wirkung bei chronisch-inflammatorischen

Darmerkrankungen als auch die vermutete Verhinderung maligner Erkrankungen, stellt sich die Frage, ob es auf Ebene der Zytokine Ansatzpunkte für diese Wirkungen gibt.

Ein Zytokin, das sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte aufweist, ist der Tumornekrose-Faktor α (TNF α) [68]:

Proapoptotische Wirkung vermittelt TNF α , indem er an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) bindet. Diese Bindung führt zu einer Interaktion von TNF-Rezeptor-assoziiierter death domain (TRADD) mit Fas-assoziiierter (FADD) und Zytokin-Rezeptor-assoziiierter (CRADD) death domain. In Folge der Zusammenlagerung von TRADD, FADD und CRADD wird über diese death domain Procaspase 8 proteolytisch gespalten, die Kaskade der Caspasen aktiviert und der „point of no return“ der Apoptose überschritten [69-72].

Die antiapoptotischen Effekte von TNF α verlaufen vor allem über die Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B). TNF α bindet an den TNFR-1, führt zu direkter Zusammenlagerung von TRADD und TNFR-assoziierten Faktor 2 (TRAF-2) [69, 71]. Dieser Komplex aktiviert die NF- κ B-inducing kinase (NIK). NIK aktiviert die Familie der I κ B-Kinasen (IKK), dies wiederum führt zur Phosphorylierung und nachfolgender Degradation von I κ B α . Bei I κ B α handelt es sich um ein inhibitorisches Protein, das an NF- κ B bindet und damit dessen Aktivierung und nukleäre Translokation verhindert. Wird das phosphorylierte I κ B α ubiquiniert und durch Proteosomen degradiert, kann NF- κ B aktiviert werden und im Kern als Transkriptionsfaktor wirken.

NF- κ B selbst liegt als Dimer vor, entweder aus verschiedenen Untereinheiten als Heterodimer oder aus zwei gleichen Untereinheiten als Homodimer. Es existieren fünf mögliche Untereinheiten: RelA (p65), NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), C-rel und RelB. Diese Untereinheiten unterscheiden sich vor allem in ihren unterschiedlichen DNA-Bindungsstellen und damit durch Unterschiede in den transkribierten Genen [73, 74]. Im Zusammenhang mit Butyrat wurden bislang vor allem p50 und p65 betrachtet [39, 75, 76].

Folge der Translokation von NF- κ B in den Kern ist die Transkription antiapoptotischer Gene wie TNF, Interleukine, Adhäsionsmoleküle u.v.m. [68-70, 77-79].

Über diese Wirkung an TNFR-1 hinaus aktiviert TNF α p38 und c-Jun Kinase (JNK) [80], die beide unter anderem zur Differenzierung führen, Proliferation inhibieren und Apoptose induzieren können [14, 38, 81, 82], aber auch selbstständig in die Transkriptionsvorgänge eingreifen können [83, 84]. Außerdem kann eine Aktivierung von p38 in einer Inhibition der NF- κ B-Aktivierung resultieren [82, 85].

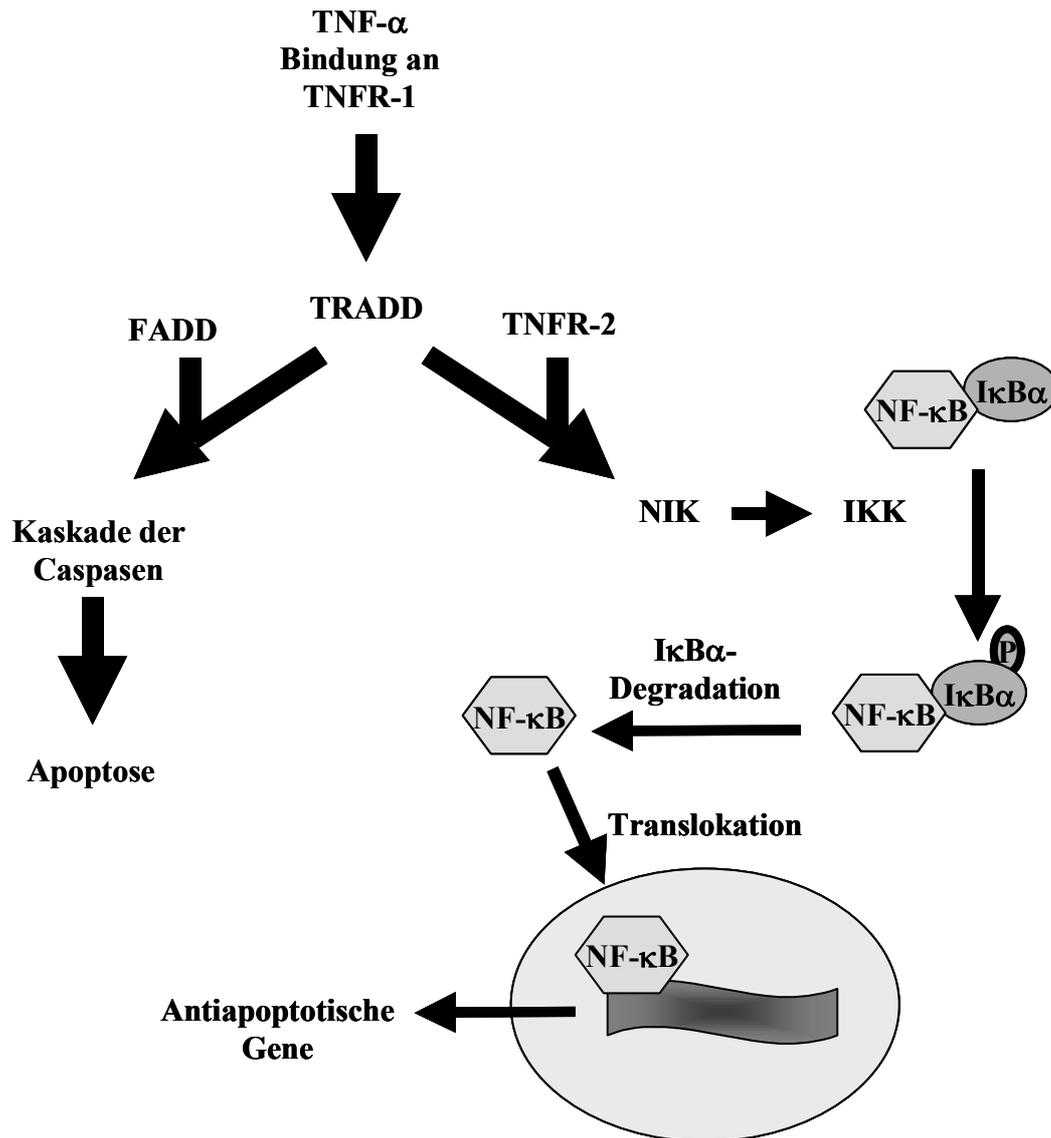


Abbildung 2: Proapoptotischer und antiapoptotischer Wirkweg von TNF α (Gerke, 1999)

Butyrat, Aspirin und TNF α wirken also teils sehr unterschiedlich, teils sehr ähnlich auf die kolorektalen Epithelzellen.

Ausgehend von Butyrat als Produkt von Nahrungsbestandteilen soll in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit dessen apoptotische Wirkung durch Aspirin als möglichem präventivem Chemotherapeutikum bzw. durch TNF α als körpereigenem Botenstoff mit sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Wirkung moduliert werden kann. Durch diese Untersuchung sollen neue Einblicke in den möglichen antikarzinogenen Mechanismus von Butyrat gegenüber dem kolorektalen Karzinom gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Verwendete Zelllinien

Für die zeit- und dosisabhängige Quantifizierung der Apoptoseinduktion durch ASS und Butyrat wurden Zellen der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) verwendet; die Ansätze zur Überprüfung eines Zusammenwirkens von TNF α mit Butyrat wurden zusätzlich noch an SW620 Zellen, der Metastasenzelllinie eines kolorektalen Karzinoms (American Type Culture Collection) durchgeführt.

Vorkultur der Zellen

Die Zellen der humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und SW620 wurden für die FACS-Analysen zu je 500.000 Zellen in 25cm² Kulturflaschen ausgesät und mit 4ml Medium inkubiert. HT29-Zellen wurden mit Dulbecos Minimum Essential Medium (Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) kultiviert, versetzt mit 10% Vol. fötalem Bovinem Serumalbumin (FBS, Life Technologies), 2% Vol. Penizillin/Streptomycin (Life Technologies), 1% Vol. Glutamat (Life Technologies), 1% Vol. NEAA (Life Technologies) und 0,4% Vol. HEPES Puffer (Life Technologies). Für Zellen der Linie SW620 wurde Minimum Essential Medium (Life Technologies) mit 10% Vol. FBS und 5% Vol. Penizillin/Streptomycin verwendet. Die Kultur der Zellen erfolgte bei 37°C unter 5% CO₂. Für EMSA und RNase Protection Assay wurden 1.000.000 Zellen in eine 75cm² Kulturflasche ausgesät.

Die Zellen wurden nach Aussaat im Brutschrank 72h gelagert, um am Boden der Kulturflasche zu adhären. Danach wurden sie für 6h mit 4ml bzw. 18ml serumfreien Medium inkubiert, um eine Synchronisation der Zellpopulation durchzuführen. Nach Ablauf der 6h wurden 0,5ml bzw. 2ml FBS zugegeben, um die Proliferation wieder anzuregen. Nach einer Gesamtkulturzeit von 96h wurden die Zellen nun mit den zu testenden Substanzen inkubiert und nach vorgegebener Zeit geerntet: In 25cm² Kulturflaschen wurden die Zellen mit 3ml PBS (Life Technologies) und 2ml Trypsin-EDTA (Life Technologies) gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin-EDTA für 5

Minuten im Brutschrank (HT-29) bzw. für 4 Minuten (SW620) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde anschließend mit 4ml Medium gestoppt. Für 75cm² Kulturflaschen betragen die adäquaten Mengen 5ml PBS, 4ml bzw. 3ml Trypsin und 7ml Medium.

Kultur der Zellen mit Aspirin und Butyrat:

Aspirin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde als 500mM Stammlösung mit Ethanol angesetzt, Butyrat (Sigma Aldrich) 200mM mit NaOH. Die für die Versuche benötigten Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit dem jeweiligen Kulturmedium erreicht.

Stimulation der Zellen mit TNF α :

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α , Sigma Aldrich) wurde gemäß Angabe des Herstellers mit sterilem PBS/1% BSA (Boehringer, Mannheim, Deutschland) gelöst zu einer Aktivität von 200.000 U/ml. Die für die Stimulation notwendige Aktivität von 500U/ml für Apoptose-Assay und RNase Protection Assay bzw. 2.000 U/ml für den EMSA wurde direkt in die Kulturflaschen pipettiert.

Apoptoseinduktion durch Aspirin und Butyrat an HT-29:

Zum Vergleich der Apoptoseinduktion durch Aspirin und Butyrat auf Zellen der humanen kolorektalen Karzinomzelllinie HT-29 wurden diese mit Aspirin in Konzentrationen von 1-5mM, mit Butyrat in Konzentrationen von 1-6mM und in verschiedenen Kombinationen (Aspirin 1mM/Butyrat 1mM, Aspirin 2mM/Butyrat 1mM, Aspirin 3mM/Butyrat 1mM, Aspirin 2mM/Butyrat 2mM Aspirin, 1mM/Butyrat 2mM, Aspirin 1mM/Butyrat 3mM) für 24h, 48h und 72h inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit die Rate der apoptotischen Zellen mittels Annexin V–Propidiumjodid–Assay bestimmt.

Apoptoseinduktion durch eine Kombination von TNF α und Butyrat an HT-29 und SW620:

Um die Auswirkungen einer Koinkubation von TNF α mit Butyrat auf kolorektale Karzinomzellen zu testen, wurden Zellen der Linien HT-29 und SW620 mit TNF α mit einer Aktivität von 500U/ml bzw. mit Butyrat in einer Konzentration von 2mM und 4mM oder in Kombination von TNF α und Butyrat 12h, 24h und 36h inkubiert. Auch für diese Ansätze wurde die Rate apoptotischer Zellen mittels eines Annexin V–Propidiumjodid–Assays bestimmt.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Für den EMSA wurden SW620 Zellen 24h bzw. 48h mit Medium bzw. Butyrat in einer Konzentration von 4mM vorinkubiert und anschließend mit TNF α in einer Aktivität 2.000U/ml für 30 Minuten stimuliert. Die Zellen wurden trypsiniert wie beschrieben und aus den Zellen ein Kernextrakt hergestellt (cf. 2.4).

RNase Protection Assay (RPA)

Für den RPA wurden SW620 Zellen mit Butyrat in einer Konzentration von 2mM und 4mM inkubiert, mit TNF α in einer Aktivität von 500U/ml stimuliert oder mit einer Kombination beider Substanzen für 24h bzw. 48h behandelt. Anschließend wurde aus den Zellen wie unter 2.5 beschrieben die Gesamt-RNA isoliert und im RPA untersucht.

2.2 Apoptosebestimmung durch eine Annexin V–Propidiumjodid–Doppelfärbung

Ein am Anfang der Apoptose stehendes Ereignis in den meisten Zellen ist die Externalisation von Phosphatidylserin. Phosphatidylserin ist ein Bestandteil der zellulären Membran, der in der lebenden Zelle nur an der Innenseite der Zellmembran

zu finden ist. Tritt die Zelle in den Apoptoseprozeß ein, ist eine der ersten Reaktionen die Externalisation von Phosphatidylserin. Diese Reaktion liegt zeitlich deutlich vor anderen Ereignissen wie DNA-Strangbruch oder morphologisch erkennbaren Veränderungen. Annexin V geht eine spezifische Bindung mit dem an die Zelloberfläche gelangten Phosphatidylserin ein. Zellen, deren Ableben durch Nekrose gekennzeichnet ist, zeigen keine Externalisation von Phosphatidylserin.

Ein anderes Ereignis im Zelltod ist der Verlust der Membranintegrität. Während dieses Ereignis in der Nekrose sehr plötzlich auftritt, also eine Art on-off-Reaktion vorliegt, zeichnen sich Zellen in der Apoptose durch einen allmählichen Verlust der Membranintegrität aus. Diesen Effekt macht man sich zunutze, um Annexin V-negative und -positive Zellen nochmals zu differenzieren. Inkubiert man nicht vorpermeabilisierte Zellen mit Propidiumjodid, einem DNA-Interkalator ohne Bevorzugung spezifischer Basen, nehmen es diese gemäß der Durchlässigkeit ihrer Membran auf.

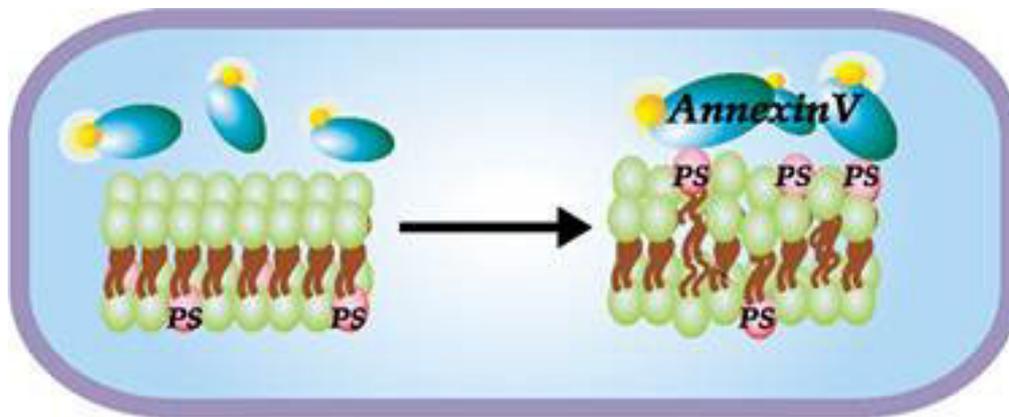


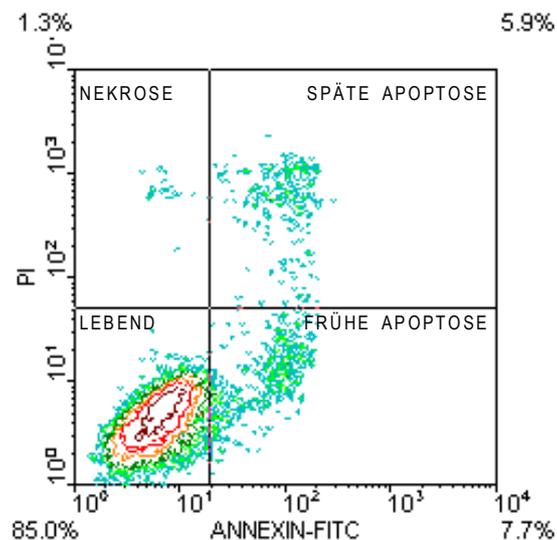
Abbildung 3: In der Apoptose wechselt Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite und ermöglicht so die Bindung von Annexin V.
(Copyright 2000-2002 B-bridge International)

Es ergeben sich also vier Populationen mit unterschiedlichen Färbereigenschaften: Lebende Zellen sind sowohl für Annexin V als auch für Propidiumjodid negativ. Die Zellen in der frühen Apoptose binden zwar bereits Annexin V, lassen aber noch kein Propidiumjodid durch ihre Membran. Mit Verlust der Membranintegrität beginnen die Zellen nun Propidiumjodid aufzunehmen, es ergibt sich eine Subpopulation spätapoptotischer Zellen bzw. von Zellen, die die Apoptose bis hin zum endgültigen Zelltod durchlaufen haben. Diese Zellen binden nun sowohl Annexin V als auch

Propidiumjodid. In dieser Phase sind die Zellen dann auch bereits durch andere Vorgänge der Apoptose wie DNA-Strangbruch gekennzeichnet [86].

Ist der auf die Zellen einwirkende Streß nun so groß, daß sie nicht in der Lage sind, den Weg der Apoptose zu beschreiten, werden sie nekrotisch, i.e. es kommt nicht mehr zur Externalisation von Phosphatidylserin, jedoch zu einem sehr schnellen Aufbruch der Zellmembran. Zellen in der Nekrose binden also nur noch Propidiumjodid und kein Annexin V.

Abbildung 4: Lebende Zellen sind negativ für Annexin V und Propidiumjodid, in der frühen Apoptose färben sie positiv für Annexin V. Mit zunehmender Membranpermeabilität nehmen sie Propidiumjodid auf, gehen also in die Spätphase der Apoptose über. Direkt geschädigte, nicht-apoptotische und nekrotische Zellen werden lediglich für Propidiumjodid positiv.



Nicht bei allen Autoren wird immer zwischen spätapoptotischen und direkt nekrotischen Zellen differenziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die hier als frühapoptotisch bezeichneten Zellen einen weiteren Meilenstein der Apoptose, den durch die TUNEL-Reaktion (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) nachweisbaren Strangbruch der DNA, noch gar nicht zeigen [86]. In den hier als spätapoptotisch bezeichneten Zellen läßt sich der Strangbruch jedoch mittels TUNEL-Reaktion nachweisen [86]. Außerdem ist die Apoptose adhärenter Epithelzellen teilweise nur durch Annexin V nachweisbar, da die Zellen vom Boden der Kulturgefäße abschilfern, bevor mit TUNEL Strangbrüche nachweisbar werden [87]. Um im folgenden also die Apoptose der gesamten Population zu betrachten, soll aus den genannten Gründen als Rate apoptotischer Zellen die Summe frühapoptotischer, also TUNEL negativer, und spätapoptotischer, TUNEL positiver, Zellen betrachtet werden.

Der Nachweis mittels Annexin V-Propidiumjodid-Doppelfärbung erlaubt also eine schnelle und methodisch einfache Bestimmung der Apoptose.

2.3 Annexin V-Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse

Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Überstand in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt, die adhärente Zellfraktion trypsiniert und diese Zellsuspension ebenfalls in das 15ml-Reaktionsgefäß überführt, um eine Analyse der kompletten Zellpopulation zu ermöglichen, i.e. von adhärennten und flottierenden Zellen. Die Zellen wurden nun für 10 Minuten bei 900 rpm (Umdrehungen pro Minute) und einer Temperatur von 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml eiskaltem Cold Binding Buffer (CBB; 10mM Hepes, 150mM NaCl, 2,5mM CaCl₂, 10mM MgCl₂, alles Sigma Aldrich, 20% BSA, Boehringer) gelöst und erneut für 10 Minuten bei 900 rpm und einer Temperatur von 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden nun in CBB auf eine Dichte der Zellsuspension von ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml gelöst und auf Eis aufbewahrt.

Pro Probe wurden jetzt je 5µl Annexin V-FITC (Sigma Aldrich, 10µg/ml in CBB) in ein 12mm x 75mm Reaktionsgefäß vorgelegt, in dieses wurden nun 495µl der Zellsuspension überführt und sachte mit dem Annexin V vermischt. Die Proben wurden für 13 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert und im Anschluß für 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Nun wurden 5µl einer Propidiumjodidlösung (Sigma Aldrich, 50µg/ml in PBS) vorgelegt, das Pellet mit 500µl CBB gelöst und danach für 15 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen nochmals für 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C abzentrifugiert und erneut in 500µl CBB gelöst.

Nach der Färbung wurden die Proben bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Sämtliche Schritte wurden auch jeweils mit einem Aliquot jedes Versuchsansatzes durchgeführt, ohne daß eine Färbung mit Annexin V oder Propidiumjodid vorgenommen wurde. Diese Proben werden im weiteren Text als Leerwerte bezeichnet. Zur Kompensation wurde pro Versuchsansatz ein Aliquot nur mit Annexin und eines nur mit Propidiumjodid gefärbt.

Die Proben wurden auf einem FACScan (Beckton Dickinson, Mannheim Deutschland) mit Anregung durch einen 488nm-Laser unter Verwendung von Lysis II Software (Beckton Dickinson) gemessen, die Messung erfolgte binnen zwei Stunden nach Abschluß der Färbung. Die Zellpopulation wurde in einem Forward Scatter (FSC) – Sideward Scatter (SSC) - Dot Plot dargestellt, FSC und SSC wurden linear definiert. Die Annexin V-Bindung wurde über die Intensität des gekoppelten FITC auf FL-1 gemessen, die Menge des gebundenen Propidiumiodids in FL-3 um eine Überstrahlung durch FITC zu vermeiden. Um eine Einstrahlen von Propidiumjodid in FL-1 zu vermeiden, wurde folgende Kompensationseinstellung durch die nur einfach gefärbten Proben ermittelt: FL-1 – FL-2: 0,2%, FL-2 – FL-1: 38,9%, FL-2 – FL-3: 42,8% und FL-3 – FL-2: 8,3%. Die Darstellung der Kanäle FL-1 und FL-3 erfolgte logarithmisch. Die Grundeinstellung zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz, ohne die eine Beurteilung der Zunahme der Fluoreszenz durch Annexin V- oder Propidiumjodid-Bindung nicht möglich wäre, wurde für jede Probe mit dem zugehörigen Leerwert vorgenommen.

Es wurden bei schneller Zählrate 30.000 Zellen pro Probe gemessen, die Messung erfolgte ohne Einschränkung.

Die Daten wurden aus dem HP-Format von Lysis II mittels LIFUTIL (Hewlett-Packard LIF Utilities for the PC, © HP 1990-92) in eine MS-DOS-Datei umgewandelt. Die Auswertung erfolgte dann mit WIN.MDI 2.8 (Joseph Trotter, © 1993-98) auf einem Windows NT-Rechner. Beide Programme sind auf der TSRI Cytometry Software Page als Download zu finden.

In der Auswertung wurden die Zellpopulationen wieder im FSC-SSC-Dot Plot dargestellt. Zellfragmente, die sich durch extrem niedrige Werte auszeichnen, wurden ebenso durch Setzen von Regionen ausgeklammert wie Dimere mit deutlich überhöhten Werten. Die Grenzen für eine spezifische Anfärbung mit Annexin V bzw. Propidiumjodid wurden über eine deutliche Zunahme gegenüber der unspezifischen Fluoreszenz der Leerwerte bestimmt.

Jeder Versuchsansatz wurde in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt, aus den jeweiligen Versuchen wurden Mittelwerte gebildet, die Standardabweichung errechnet und die Signifikanz der Werte mittels des Students t-Tests für ein Signifikanzniveau von 5% geprüft. Die statistischen Berechnungen wurden

mit MS – Excel 8.0 durchgeführt. Die Ergebnisdarstellung erfolgt in der Arbeit in Form von Blockdiagrammen, die Konfidenzintervalle zeigen die Standardabweichung an.

2.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Zum Nachweis einer Inhibition der nukleären Translokation von NF- κ B durch Butyrat wurde ein Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) an SW620 Zellen durchgeführt. Zusammenfassend wurde ein Extrakt aus nukleären Proteinen hergestellt, mit einem mit radioaktivem Phosphor markiertem NF- κ B-Ziel-DNA-Oligonukleotid inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. So können im Gelshift spezifische Protein-DNA-Interaktionen sensitiv und quantitativ nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der einzelnen NF- κ B-Untereinheiten wurde ein Super-shift-EMSA durchgeführt, bei dem die Mischung aus Kernextrakt und Oligonukleotid mit gegen die einzelnen Untereinheiten spezifischen Antikörpern inkubiert wurden, um so die an der Reaktion beteiligten NF- κ B-Untereinheiten genauer zu definieren. Der Supershift stellt eine Variante des EMSA dar, bei welcher die Zugabe eines spezifischen Antikörpers den DNA-Proteinkomplex in der Elektrophorese verstärkt retardiert. Zu dieser Retardierung kommt es, da durch Bindung des Antikörpers an den Protein-DNA-Komplex ein größerer Komplex entsteht, dessen Laufgeschwindigkeit in der Gelelektrophorese reduziert ist.

Für den EMSA wurden die Zellen 24h bzw. 48h mit Medium bzw. Butyrat in einer Konzentration von 4mM vorinkubiert und anschließend mit TNF α in einer Aktivität von 2.000U/ml für 30 Minuten stimuliert. Die Zellen wurden trypsiniert wie beschrieben und aus den Zellen ein Kernextrakt [88] hergestellt. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 8 Minuten bei 4°C mit Lysepuffer (0.1% Nonidet P-40, 10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Dithiothreitol [DTT], 2 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF], 0.5 mol/L Sucrose, and 2 μ g/mL Leupeptin, alles Sigma Aldrich) inkubiert, das Lysat mit den Zellschaber in ein 50ml-Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Im Überstand befindet sich nun die zytoplasmatische Proteinfraction, im Pellet die nukleäre Fraktion.

Das Pellet wurde nun mit Lysepuffer ohne Nonidet P-40 gewaschen, für 10 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert, in 15µl eines high-salt Puffer (20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, 420 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 5% Glycerol, 0.5 mmol/L PMSF, and 2 µg/mL Leupeptin), gelöst, 40 Minuten auf Eis inkubiert und wieder für 10 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Die Kernextrakte wurden dann mit 22.5 µl eines low-salt Puffers (20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, 50 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 20% Glycerol, 0.5 mmol/L PMSF, and 2 µg/mL Leupeptin) gemischt.

Nun wurden 4µg des Kernextrakts mit 4.000 bis 8.000 cpm (entsprechend 25ng) einer ³²P-markierten NF-κB Oligonukleotidprobe, entsprechend einem κB-Enhancer-Elements des IL-2-Promotors 3'-GACCAAGAGGGATTTACCCCTAAATC-5' [89], inkubiert. Um eine unspezifische Bindung zu verhindern, wurde der Reaktionsmischung 1mg kompetitive DNA (poly-dI/dC) auf 4µg nukleäres Protein zugegeben. Die Proben wurden nun für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (6%) bei 200V/15cm fraktioniert. Die Visualisierung erfolgte mittels Autoradiographie auf einen Röntgenfilm (Medical X-ray, FUJI Photo Film, Japan).

Für den Super-shift-EMSA wurde bei der Inkubation jeweils 1µl eines Antikörpers gegen die NF-κB-Untereinheiten p65, C-Rel, RelB, p50 und p52 hinzugegeben und die Inkubationszeit vor der elektrophoretischen Auftrennung auf 60 min verlängert. Jedes Experiment wurde zur Verifizierung dreimal wiederholt.

2.5 RNA-Isolation und RNase Protection Assay

2.5.1 RNA-Isolation mit RNeasy Mini Kit

SW620 Zellen wurden für 24h bzw. 48h entweder mit Butyrat in einer Konzentration von 2mM und 4mM oder mit TNFα in einer Aktivität von 500U/ml inkubiert oder mit einer Kombination beider Substanzen behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen wie beschrieben trypsinisiert, einmal mit 10ml PBS gewaschen und bei 900 rpm und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wird in 1ml PBS resuspendiert, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei 12.000 rpm und 4°C für 10 Minuten

abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Das Pellet wurde in 600 μl Lysisbuffer (RLT-Buffer, 1% β -Mercaptoethanol, Guanidinium-Isothiocyanat, alles Quiagen) komplett gelöst, die Lösung auf eine RNeasy shredder column (Quiagen) aufgetragen und 2 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Eluat werden 600 μl 70% Ethanol gegeben, diese Mischung in zwei Durchgängen auf die mitgelieferte Säule gegeben und die Säule 1 Minute bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säulen wurden nun einmal mit RPE-Puffer (Quiagen) und zweimal mit mit Ethanol versetztem RPE-Puffer (Quiagen, mit Ethanol versetzt) gewaschen. Abschließend wurde die RNA mit zweimal 30 μl RNase-freiem H_2O durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur für 1 Minute eluiert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 2 μl RNA-Lösung mit 98 μl RNase-freiem H_2O gemischt und an einem UV-Spectrophotometer (Ultrospec 3000 UV/Vis, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) gemessen, als Eichlösung wurde RNase-freies H_2O verwendet. Das Verhältnis der Absorption bei 260nm zu Absorption bei 280nm (Ratio A_{260}/A_{280}) wurde als Maß für die Reinheit der RNA verwendet. Die Ratio A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Für die Berechnung der RNA-Menge gilt $A_{260} = 1 \sim 40\text{ng}/\mu\text{l}$ RNA, also gilt für die Gesamtkonzentration K in $[\text{ng}/\mu\text{l}] = 50 \times 40 \times A_{260}$ bzw. K in $[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 2 \times A_{260}$.

Zur Sicherung der Qualität der isolierten RNA wurde noch eine Elektrophorese in einem denaturierenden Formaldehyd/Agarose-Gel durchgeführt. Zur Herstellung eines 1% Gels wurden 0,4g Agarose mit 4ml 10X FA-Puffer (50mM Natriumacetat, 10mM EDTA, 200mM MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure), pH 7,0, alles Sigma Aldrich) und 30ml RNase-freiem H_2O in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Die Mischung kühlte wieder ab, bei einer Temperatur von 55°C wurden 2ml Formaldehyd (37%, Sigma Aldrich) und 1 μl Ethidiumbromid (10mg/ml, Sigma Aldrich) zugegeben und das flüssige Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Als Laufprobe wurde 1 μg RNA mit RNase-freiem H_2O und 5X RNA-Ladepuffer (1,6‰ gesättigte Bromphenolblaulösung (Sigma Aldrich), 8‰ EDTA (500mM, pH 8,0, Life Technologies), 7,2% Formaldehyd (37%, Sigma Aldrich), 20%

Glycerol (100%, Sigma Aldrich), 30,84% Formamid (Sigma Aldrich), 40% 10X FA-Puffer, 1% Rnase-freies H₂O) auf ein Gesamtprobenvolumen von 10µl versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V in 1X FA-Puffer. Die RNA interagiert mit Ethidiumbromid und ist bei einer Wellenlänge von 312nm nachweisbar. Als Qualitätskennzeichen der RNA wurde ein gut abgegrenzter Nachweis der ribosomalen RNA-Untereinheiten 28S und 18S im Verhältnis 1,5-2,5:1 festgelegt.

2.5.2 RNase Protection Assay (RPA)

Zur Prüfung des Einflusses von Butyrat auf die Expression verschiedener NF-κB abhängiger anti-apoptotischer Faktoren auf RNA-Ebene wurde das kommerzielle Multi-Probe Template Set hAPO-5 von Pharmingen (Pharmingen, San Diego, USA) nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers verwendet.

Sondenherstellung:

Um Sonden (probes) für den RNase Protection Assay (RPA) herzustellen, wurde DNA aus dem Template Set mittels in vitro Transkription in mit biotinylierten UTPs markierte antisense RNA umgeschrieben.

1µl Template DNA wurde mit 9µl Rnase-freiem H₂O, 1µl Rnasin, 2µl DTT, 4µl 5X Transcription Buffer, 1µl T₇ RNA Polymerase (alles In vitro transcription Kit, Pharmingen) und 2µl Biotin RNA Labeling Mix (Boehringer, Mannheim) vermischt und 1h bei 37°C inkubiert. Die Template DNA wurde nun 2µl DNase bei 37°C für 30 Minuten verdaut. Zur Aufreinigung der synthetisierten RNA wurden 26µl 2mM EDTA (Sigma Aldrich), Yeast RNA (In vitro transcription Kit, Pharmingen), 25µl Phenol pH 4,3 (Sigma Aldrich) und 25µl Chloroform:Isoamylalkohol 50:1 (Sigma) zugegeben. Die Mischung wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere klare Phase wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, erneut mit 50µl Chloroform:Isoamylalkohol 50:1 versetzt und für 2 Minuten zentrifugiert. Die obere klare Phase wurde nun wiederum in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 50µl Ammoniumacetat 4M (In vitro transcription Kit, Pharmingen) und 250µl eiskaltem

Ethanol gemischt, 30 Minuten bei -80°C inkubiert und die RNA durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C ausgefällt. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit $100\mu\text{l}$ 90% Ethanol gewaschen und erneut für 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde kurz getrocknet und in $250\mu\text{l}$ Hybridisation Buffer (RiboQuant, Pharmingen) gelöst. Die Lagerung der biotinylierten Sonden bis zum Gebrauch erfolgt bei -20°C .

RPA:

$5\mu\text{g}$ der isolierten RNA wurden mit $50\mu\text{l}$ Ammoniumacetat und $250\mu\text{l}$ eiskaltem Ethanol versetzt, 30 Minuten bei -80°C inkubiert und durch Zentrifugation mit 13.000g bei 4°C für 15 Minuten gefällt. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet getrocknet und in $8\mu\text{l}$ Hybridisation Buffer gelöst.

Zu jeder Probe wurden nun $2\mu\text{l}$ RNA-Sonde zugegeben und das Gemisch mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma Aldrich) gedeckt. Die Proben wurden nun bei 90°C in einem Wasserbad inkubiert, nach langsamer Abkühlung des Wasserbades auf 56°C verblieben die Proben bei dieser Temperatur 12-16h zur Hybridisierung der Proben-RNA mit den RNA-Sonden.

Die nicht-hybridisierte Proben-RNA wurde nun für 45 Minuten bei 30°C durch RNase A + T₁ Mix (in RNase Buffer, Riboquant, Pharmingen) verdaut, der RNase-Verdau danach durch 15 Minuten Inkubation mit Proteinase K (RiboQuant, Pharmingen) bei 37°C gestoppt.

Zur Aufreinigung der hybridisierten RNA-Abschnitte wurden $65\mu\text{l}$ Phenol pH 4.5 und $65\mu\text{l}$ Chloroform-Isoamylalkohol 50:1 zugegeben, die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert und die klare obere Phase in ein neues $1,5\text{ml}$ -Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde nun mit $650\mu\text{l}$ eiskaltem 100% Ethanol und $120\mu\text{l}$ 4M Ammoniumacetat vermischt, 30 Minuten bei -80°C inkubiert, bei 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde nun in $5\mu\text{l}$ RNA-Ladepuffer gelöst, 3 Minuten auf 90°C erhitzt, auf Eis geschockt und bis zur Elektrophorese auf Eis gelagert. Als Positivkontrolle diente eine 750fach mit Ladepuffer verdünnte RNA-Sonde.

Zur Auftrennung der Proben erfolgte eine Elektrophorese bei 200V für 45 Minuten in einem 5% Acrylamid/8M Urea Gel (5% Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 (Böhringer

Mannheim), 8M Urea (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1X TBE (0,9M Tris base (Merck), 0,9M Borsäure (Merck), 20mM EDTA (Sigma Aldrich) in RNase-freiem H₂O), 10% Ammoniumpersulfat (Sigma Aldrich), TEMED (Sigma Aldrich)). Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die RNA-Abschnitte für 5 Minuten bei 50mA und anschließend für 45 Minuten bei 200mA auf eine positiv geladene Nylonmembran (BrightStar-PlusTM Nylon Membrane, Ambion) geblottet (Mini Trans-Blot Module, BioRad) und danach durch 2 Minuten UV-Crosslinking ($\lambda=312$, Biometra TI3) immobilisiert.

Die auf die Membran übertragene, mit Biotin markierte RNA wurde dann mittels einer Biotin-Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Reaktion (Bright StarTM Bio DetectTM: Nonisotopic Detection Kit, Ambion; alle Puffer im Kit enthalten) dargestellt. Die Membran wurde zweimal 5 Minuten mit Waschpuffer, anschließend zweimal 5 Minuten mit Blocking Buffer gewaschen. Nun wurde die Membran erst 30 Minuten in Blocking Buffer, danach 30 Minuten mit Konjugatlösung (1 μ l Streptavidin ad 10ml Blocking Buffer) inkubiert. Um überschüssige Konjugatlösung zu entfernen, wurde die Membran einmal 10 Minuten in Blocking Buffer, dreimal 5 Minuten in Waschpuffer und zweimal 2 Minuten in Assay Buffer gewaschen. Zur Detektion der Alkalischen Phosphatase wurde die Membran 5min mit CDP-Star-Lösung inkubiert, anschließend kurz auf Filterpapier getrocknet, in Plastikfolie gewickelt und ein Röntgenfilm (Medical X-ray, FUJI Photo Film, Japan) 1-10 Minuten belichtet

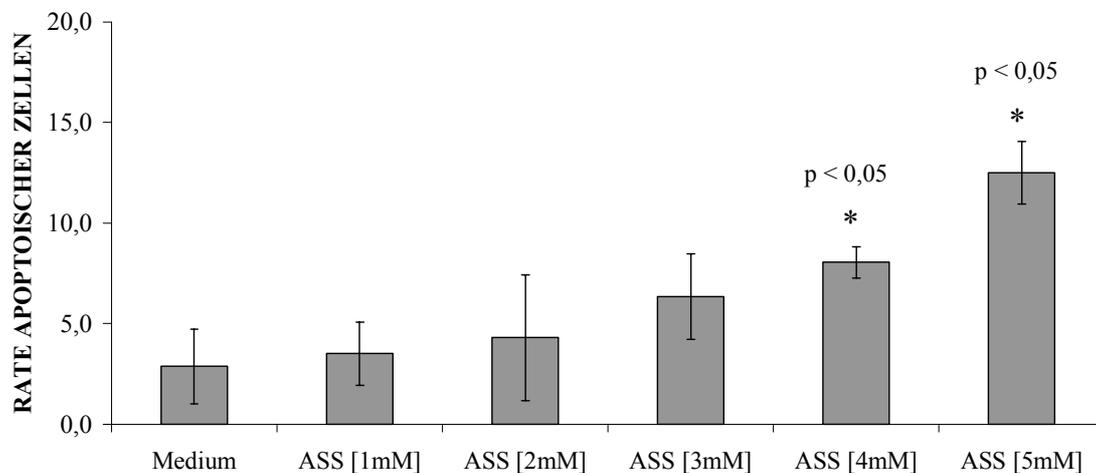
3. Ergebnisse

3.1 Apoptoseinduktion durch Aspirin und Butyrat an HT-29 Zellen

3.1.1 Apoptoseinduktion durch Aspirin

Bei einer Inkubationszeit von 24h nimmt die Rate apoptotischer Zellen mit ansteigender Dosis zu. Die FACS-Analyse ergibt einen Anstieg apoptotischer Zellen bereits nach einer Inkubation mit 1mM Aspirin im Vergleich zur Mediumkontrolle (3,5 % vs 2,9 %), mit Erhöhung der Konzentrationen auf 4mM ist der Anstieg signifikant gegenüber dem Medium (8,1% vs. 2,9%, $p < 0,05$), nach Inkubation mit 5mM Aspirin kommt es zu einem signifikanten Anstieg der apoptotischen Population gegenüber einer Konzentration von 4mM (12,5% vs. 8,1%, $p < 0,05$).

APOPTOSEINDUKTION DURCH ASPIRIN AN HT-29 / 24h



Graphik 1: Statistisch gemittelt ergab sich für die Mediumkontrolle eine Rate apoptotischer Zellen von 2,9%, für eine Konzentration von 1mM Aspirin 3,5%, für 2mM 4,3%, für 3mM 6,3%, für 4mM 8,1% und für 5mM Aspirin 12,5%. Signifikant ist lediglich der Anstieg zwischen Medium und 4mM Aspirin ($* p < 0,05$) bzw. zwischen 4mM Aspirin und 5mM Aspirin ($* p < 0,05$).

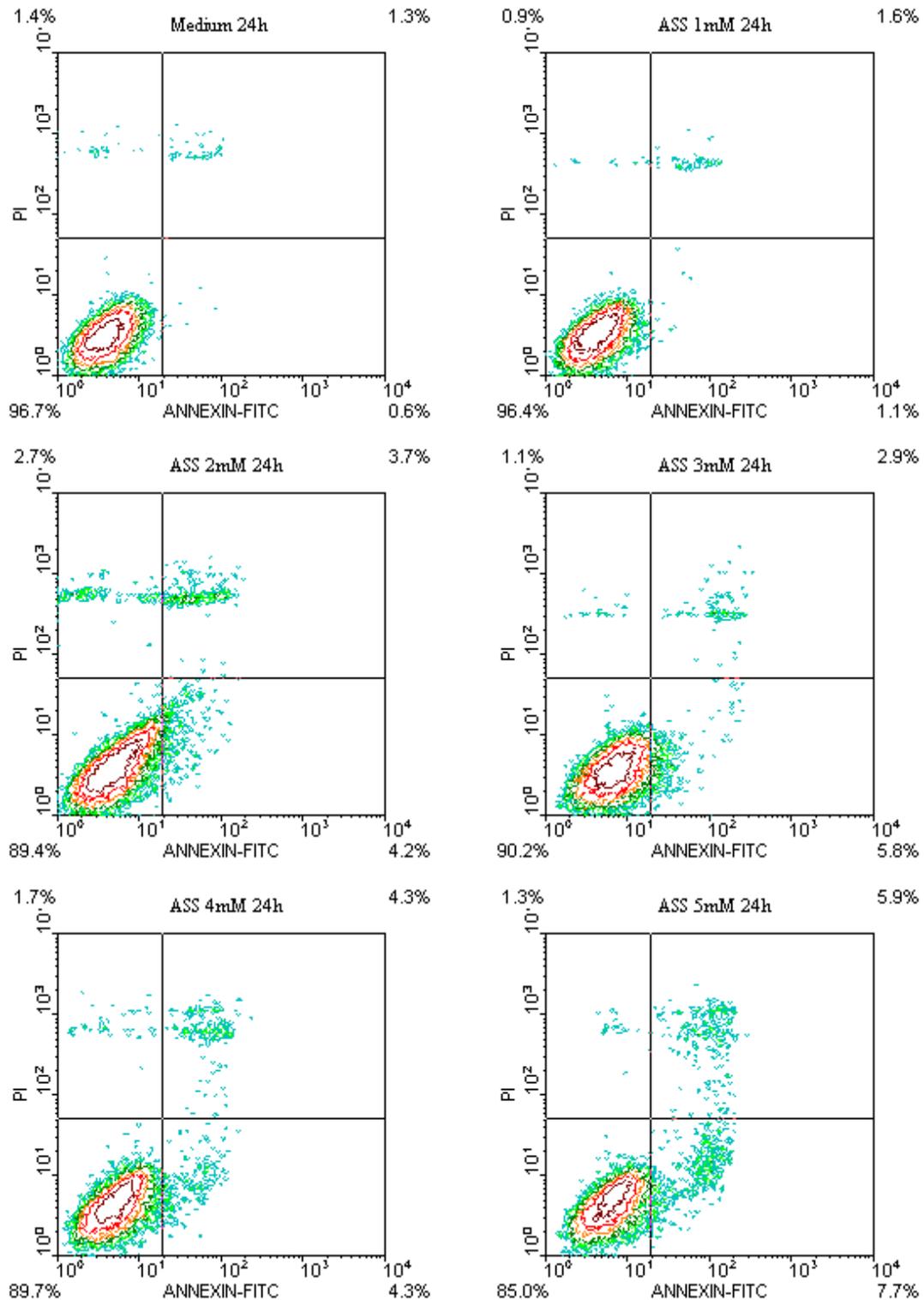
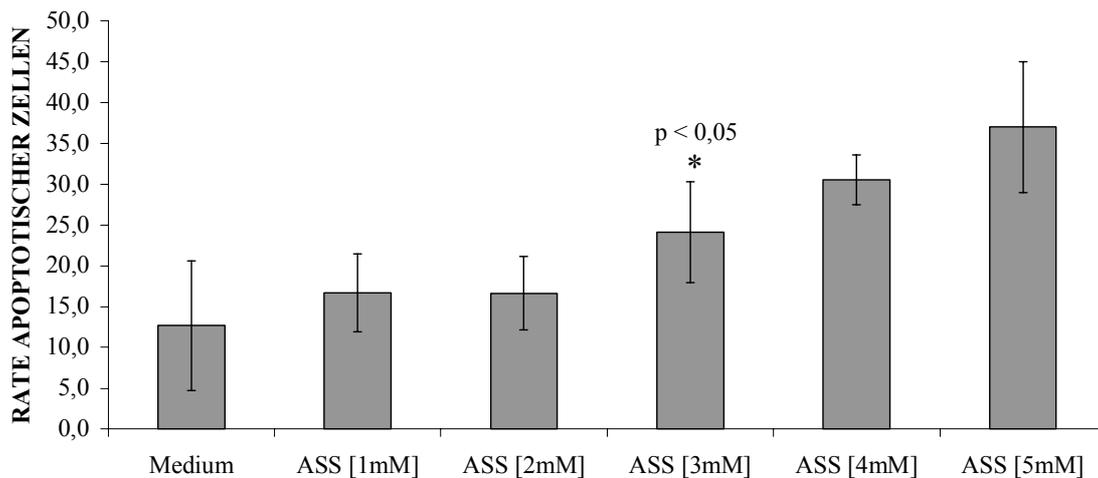


Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der Ergebnisse eines von fünf unabhängigen Experimenten. Bereits Aspirin 1mM zeigt eine höhere Rate apoptotischer Zellen gegenüber der Mediumkontrolle, mit Erhöhung der Aspirindosis kommt es zu einer Zunahme der Rate apoptotischer Zellen.

Nach einer Inkubationszeit von 48h nimmt die Rate apoptotischer Zellen bis zu einer Konzentration von 2mM nichtsignifikant ($p \geq 0,05$) gegenüber der Mediumkontrolle zu, ab einer Konzentrationen von 3mM Aspirin findet sich eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Rate apoptotischer Zellen gegenüber der Mediumkontrolle (Medium 12,7%, Aspirin 3mM 24,1%, Aspirin 4mM 30,6%, Aspirin 5mM 37,0%)

**APOPTOSEINDUKTION DURCH ASPIRIN AN
HT-29 / 48h**



Graphik 2: Nach 48h ergaben sich für die Mediumkontrolle 12,7% apoptotischer Zellen, für 1mM Aspirin 16,7%, für 2mM 16,6% für 3mM 24,1% für 4mM 30,6% und für 5mM Aspirin 37% apoptotischer Zellen. Signifikant ($p < 0,05$, *) war die Erhöhung der Rate apoptotischer Zellen gegenüber der Mediumkontrolle erst ab einer Konzentration von mindestens 3mM Aspirin.

Werden die Zellen für 72h mit Aspirin inkubiert, nimmt die Rate apoptotischer Zellen weiter zu, allerdings ist eine genaue und differenzierte Aussage auf Grund des bereits in der Mediumkontrolle sehr hohen Anteils direkt nekrotischer Zellen (teilweise über 30% der Gesamtpopulation) kaum zu treffen. Auch sind die Populationen, die mit hohen Dosen Aspirin ($> 3mM$) über 72h behandelt wurden, so geschädigt, daß eine statistische Begutachtung nicht mehr durchführbar ist.

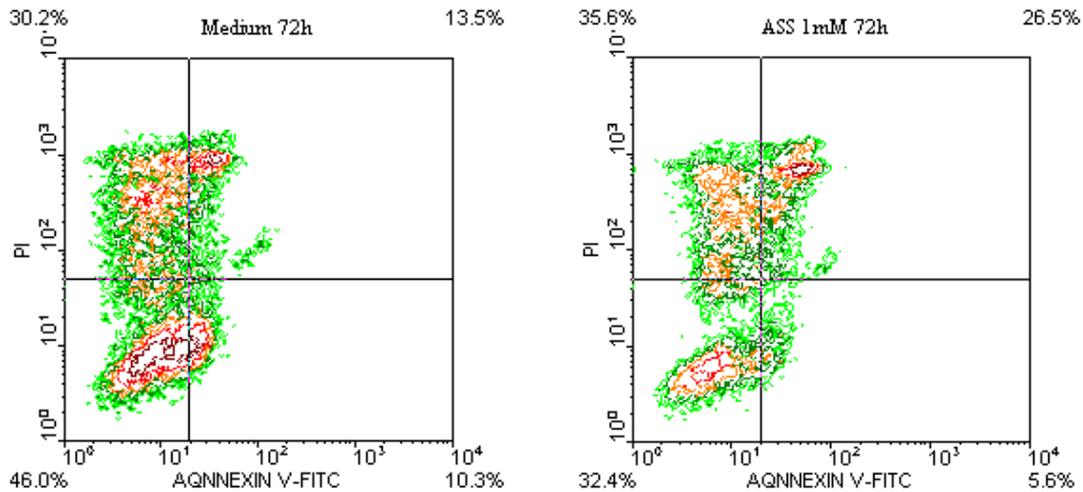
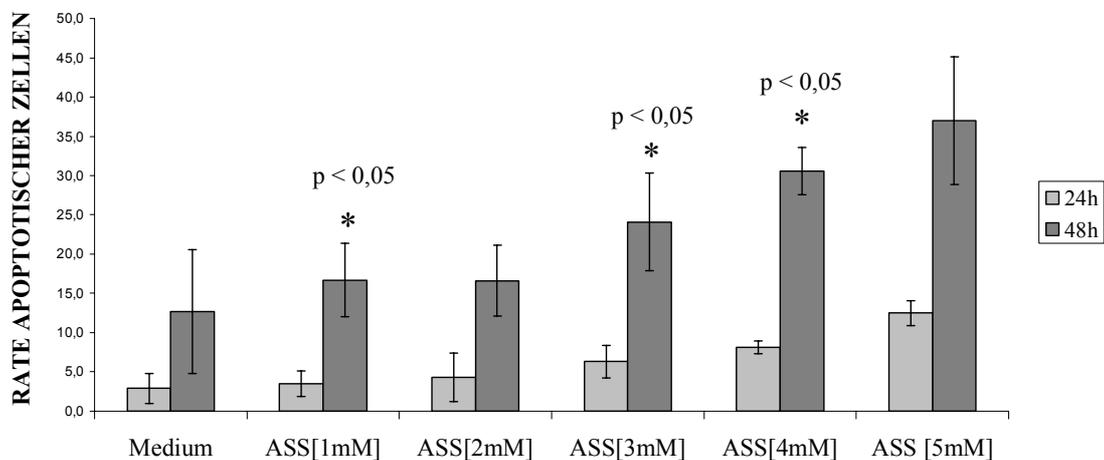


Abbildung 6: Eine Inkubation der Zellen über 72h resultierte in einer extremen Zunahme der nekrotischer Zellen bereits in der Mediumkontrolle, dieser Effekt wurde bereits bei niedrigen Konzentrationen von Aspirin noch verstärkt, eine sichere Bewertung der FACS-Analysen ist nicht möglich.

ZEITLICHER VERLAUF DER APOPTOSEINDUKTION DURCH ASPIRIN AN HT-29



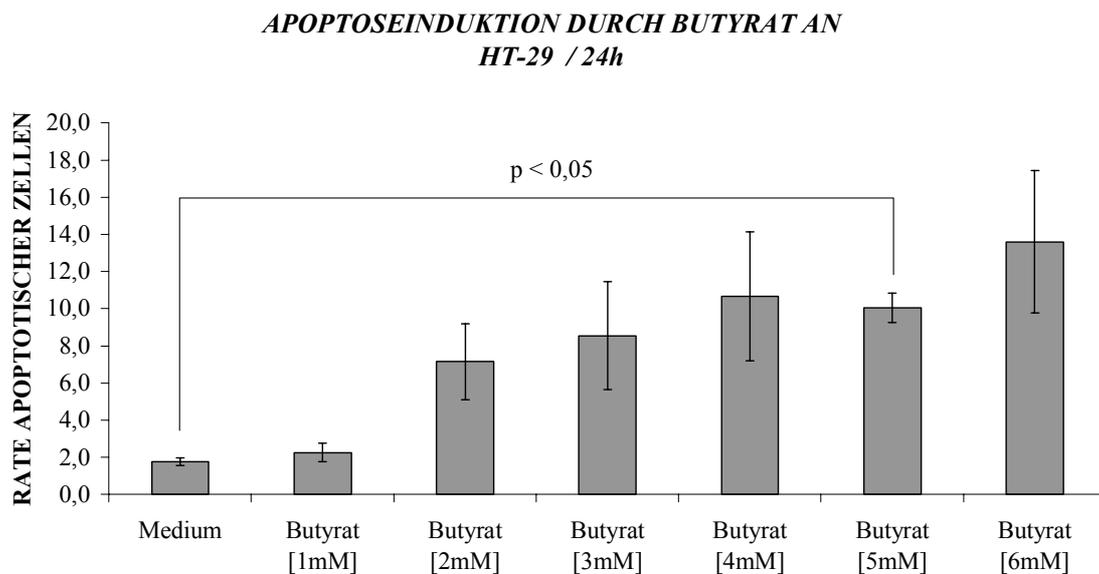
Graphik 3: In der Mediumkontrolle stieg die Rate apoptotischer Zellen nichtsignifikant ($p \geq 0,05$) von 2,9% auf 12,7% an. Unter Inkubation mit 1mM Aspirin stieg die Rate apoptotischer Zellen signifikant ($p < 0,05$, *) von 3,5% auf 16,7% an, unter 2mM Aspirin kam es zu einem nichtsignifikanten ($p \geq 0,05$) Anstieg der Rate apoptotischer Zellen von 4,3% auf 16,6%. Eine Inkubation mit 3mM Aspirin resultierte in einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen von 6,3% auf 24,1% ($p < 0,05$, *). Wurden die Zellen mit 4mM Aspirin behandelt, kam es zu einem signifikanten Anstieg der apoptotischen Population von 8,1% auf 30,6% ($p < 0,05$, *). Durch Inkubation mit 5mM Aspirin kam es zu einem nichtsignifikanten Anstieg von 12,5% auf 37,0%.

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich bereits für die Mediumkontrolle ein, allerdings nichtsignifikanter ($p \geq 0,05$), Anstieg der Rate apoptotischer Zellen zwischen 24h und 48h. Unter Behandlung mit 1mM, 3mM und 4mM Aspirin erfolgt ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) des apoptotischen Populationsanteils, bei einer Aspirinkonzentration von 2mM und 5mM ist der Anstieg nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Faßt man nun die Ergebnisse einer Inkubation mit Aspirin zusammen, ist die Apoptoseinduktion abhängig von Inkubationszeit und Konzentration. Bereits nach 24h kommt es durch eine Inkubation mit 1mM Aspirin zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose, die Rate apoptotischer Zellen steigt mit zunehmender Aspirinkonzentration an. Eine Verlängerung der Inkubation auf 48h führt bereits ab einer Aspirinkonzentration von 1mM zu einer signifikanten Zunahme gegenüber einer Inkubationszeit von 24h, während in der Mediumkontrolle kein signifikanter Unterschied zwischen 24h und 48h besteht.

3.1.2 Apoptoseinduktion durch Butyrat

Nach einer Inkubationszeit von 24h mit 1mM Butyrat bleibt die Rate apoptotischer Zellen unverändert gegenüber der Mediumkontrolle, ab einer Konzentration von 2mM Butyrat zeigt sich eine nichtsignifikante ($p \geq 0,05$) Zunahme des apoptotischen Anteils der Gesamtpopulation bis zu einer Butyratkonzentration von 4mM. Eine Erhöhung der Butyratkonzentration auf 5mM resultiert nicht in einem Anstieg gegenüber 4mM, der Anstieg gegenüber der Mediumkontrolle ist jedoch signifikant (10,1% vs 1,8%, $p < 0,05$). Unter einer Inkubation mit 6mM Butyrat kommt es erneut zu einer Zunahme der Rate apoptotischer Zellen, nichtsignifikant gegenüber einer Konzentration von 5mM Butyrat ($p \geq 0,05$).



Graphik 4: Mit zunehmender Konzentration von Butyrat kommt es zu einem Anstieg der Rate apoptotischer Zellen, bis zu einer Konzentration von 4mM allerdings nichtsignifikant ($p \geq 0,05$). Ab einer Konzentration von 5mM ist die Zunahme der apoptotischen Population signifikant ($p < 0,05$) gegenüber dem Medium.

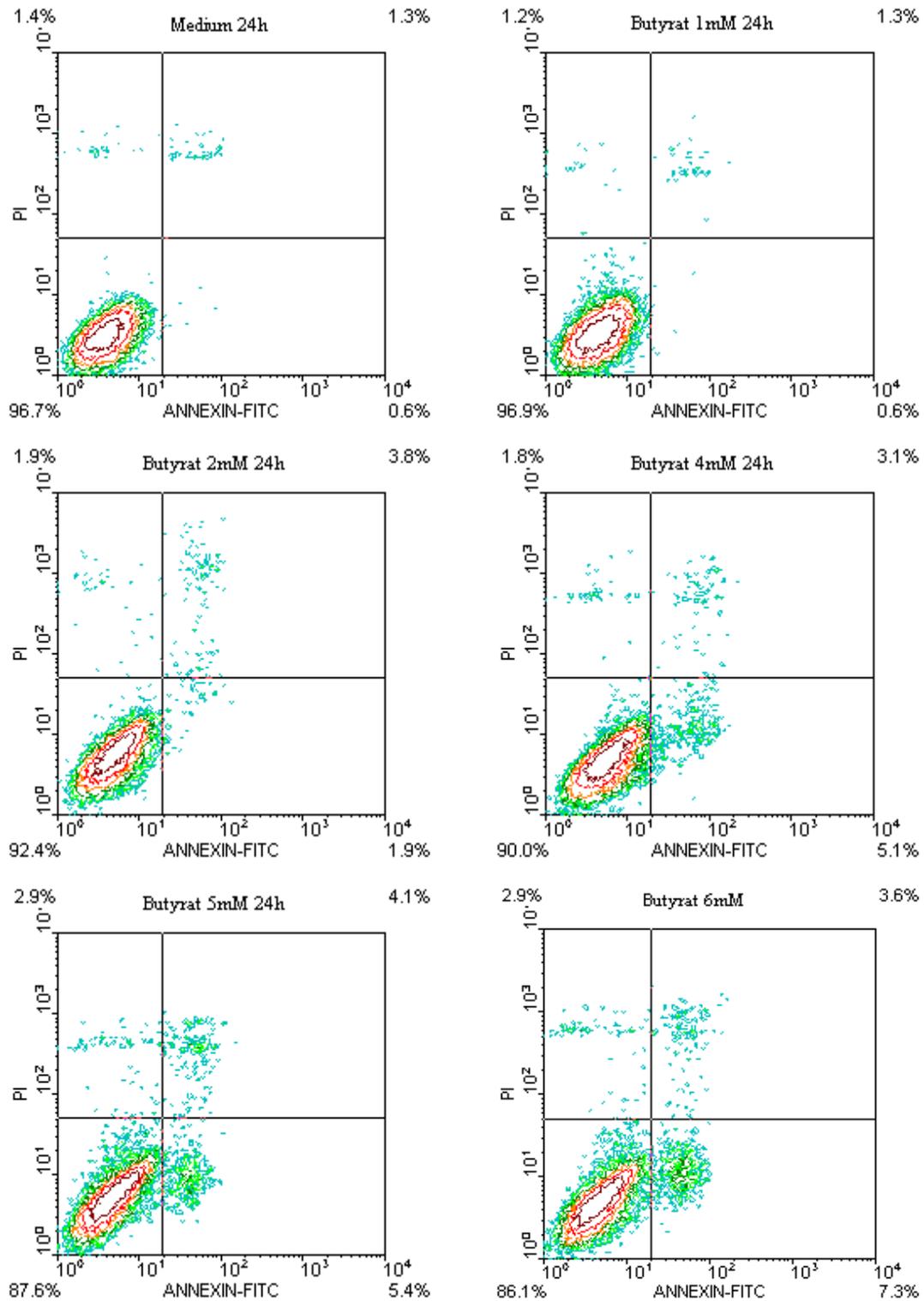
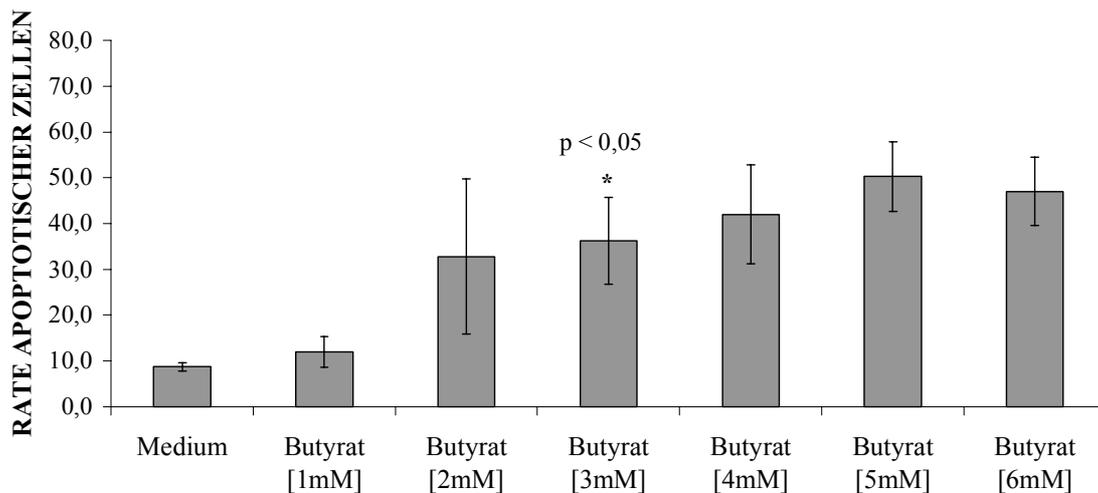


Abbildung 7: Die Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an Butyrat resultiert in einer zunehmenden Rate apoptotischer Zellen ab einer Konzentration von 2mM, eine niedrigere Konzentration hat nur einen minimalen Effekt.

Nach einer Inkubationszeit von 48h mit Butyrat nimmt die Rate apoptotischer Zellen unter ansteigender Konzentration kontinuierlich zu bis auf ca. 50% bei 5mM Butyrat. Höhere Konzentrationen verstärken die Apoptose unwesentlich, jedoch nimmt der Anteil direkt nekrotischer Zellen deutlich zu.

**APOPTOSEINDUKTION DURCH BUTYRAT AN
HT-29 / 48h**



Graphik 4: Nach Inkubation mit Butyrat für 48h kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme des apoptotischen Anteils der Population bis zu einer Konzentration von 5mM, allerdings ist die erste signifikante Zunahme gegenüber der Mediumkontrolle erst bei einer Konzentration von 3mM Butyrat zu verzeichnen ($p < 0,05$). Ab 6mM Butyrat sinkt die Rate apoptotischer Zellen zugunsten des Anteils direkt nekrotischer Zellen.

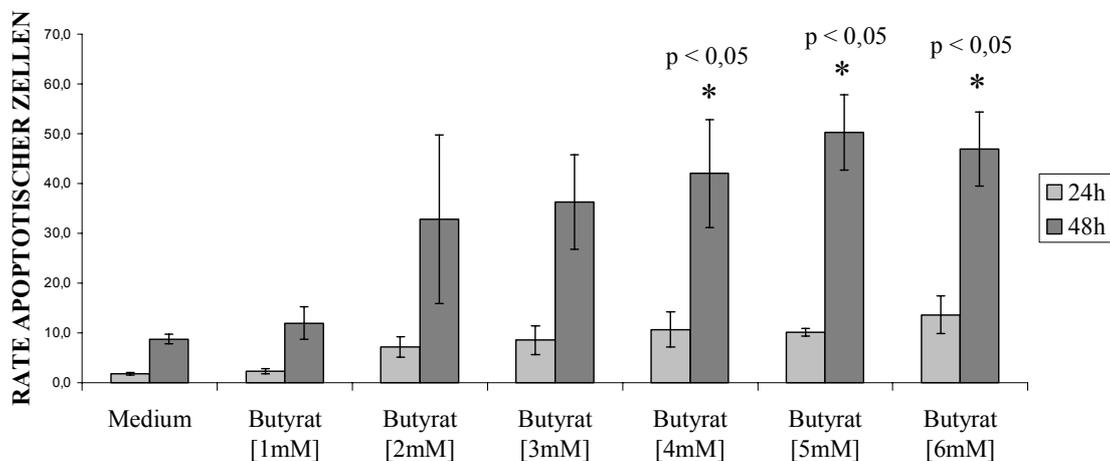
Ab einer Konzentration von 3mM kommt es zu einer im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikanten Zunahme (36,2% vs 8,8% , $p < 0,05$). Nach Inkubation mit 4mM Butyrat steigt die Rate apoptotischer Zellen gegenüber 3mM nichtsignifikant ($p \geq 0,05$) an, nach 5mM Butyrat nochmals signifikant gegenüber 4mM Butyrat ($p < 0,05$). Ab 6mM Butyrat fällt der Anteil apoptotischer Zellen wieder ab, es kommt allerdings zu einer Zunahme nekrotischer Zellen.

Nach Inkubation mit Butyrat für 72h nimmt ab einer Konzentration von 1mM Butyrat der Anteil apoptotischer Zellen zugunsten des direkt nekrotischen Anteils wieder ab, es wird letztlich der nekrotische Anteil zur bestimmenden Population.

Im zeitlichen Verlauf kommt es in der Mediumkontrolle zwischen 24h und 48h zu einer nichtsignifikanten ($p \geq 0,05$) Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen, ebenso unter 1mM bis 3mM Butyrat. Bei Inkubation mit 4mM bzw. 5mM Butyrat erhöht sich der

Anteil apoptotischer Zellen signifikant ($p > 0,05$) zwischen 24h und 48h von 10,7% bzw. 10,1% auf 42,0% bzw. 50,2%. Auch eine Inkubation der Zellen mit 6mM Butyrat resultiert in einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) apoptotischer Zellen zwischen 24h und 48h, allerdings ist der Rückgang des apoptotischen zugunsten des direkt nekrotischen Anteils gegenüber 5mM Butyrat für 48h (50,2% apoptotische Zellen) zu beachten.

**ZEITLICHER VERLAUF DER APOPTOSEINDUKTION
DURCH BUTYRAT AN
HT-29**



Graphik 6: Zwischen 24h und 48h kommt es im Medium zu einem nichtsignifikanten ($p \geq 0,05$) Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen von 1,8% auf 8,8%. Unter Inkubation mit 1mM Butyrat erhöht sich die Rate apoptotischer Zellen nichtsignifikant ($p \geq 0,05$) von 2,3% auf 12,0%, unter 2mM Butyrat von 7,2% auf 32,8%. Nach Behandlung mit 3mM Butyrat erhöhte sich die Rate apoptotischer Zellen nichtsignifikant ($p \geq 0,05$) von 8,6% auf 36,2%. Bei Inkubation der Zellen mit 4mM Butyrat kam es zwischen 24h und 48h zu einem signifikanten ($p < 0,05$, *). Anstieg der apoptotischen Population von 10,7% auf 42,0%. Eine Behandlung der Zellen mit 5mM Butyrat resultierte in einem signifikanten Anstieg der Rate apoptotischer Zellen zwischen 24h und 48h von 10,1% auf 50,2% ($p < 0,05$, *). Eine Inkubation mit 6mM Butyrat ergab einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Population zwischen 24h und 48h von 13,6% auf 47,0% ($p < 0,05$, *).

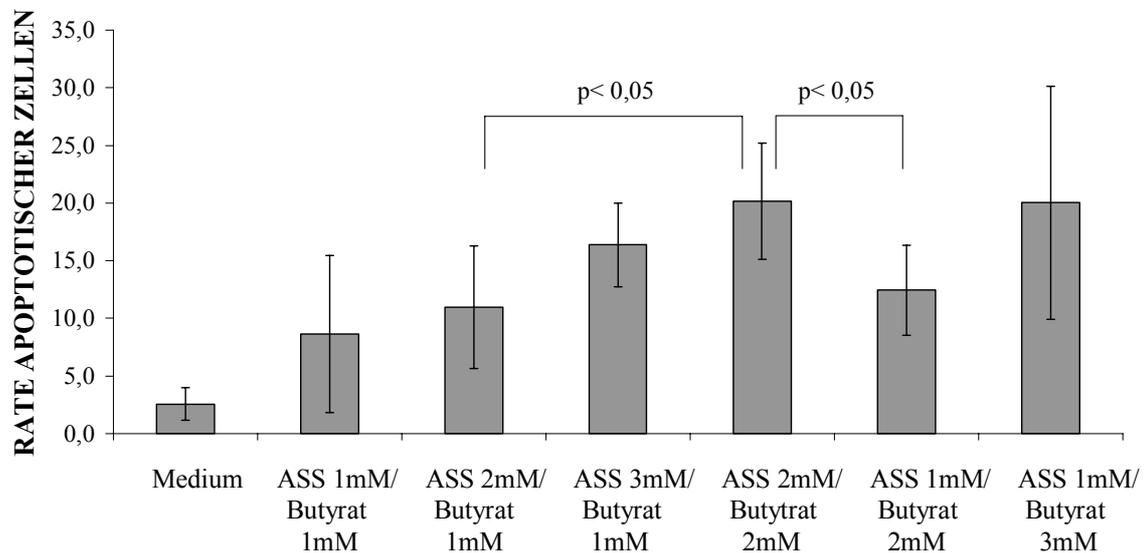
Zusammenfassend betrachtet induziert Butyrat sowohl zeit- als auch dosisabhängig Apoptose. Bereits nach 24h kommt es ab einer Konzentration von 5mM Butyrat zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils der apoptotischen Zellen, erhöht man die Inkubationszeit auf 48h, findet man bereits ab einer Konzentration von 3mM eine signifikante Verstärkung der Apoptose, ab einer Konzentration von 4mM steigt der Anteil apoptotischer Zellen von 24h auf 48h signifikant an.

3.1.3 Apoptoseinduktion durch eine Kombination von Aspirin und Butyrat

In einem kurzen Überblick werden nun die einzelnen Kombinationsversuche dargestellt. Im anschließenden Kapitel werden diese Ergebnisse den Ergebnissen der Einzelsubstanzen gegenübergestellt.

Nach 24h ergibt sich bereits ab einer Konzentration von 2mM Aspirin mit 1mM Butyrat bzw. 1mM Aspirin mit 2mM Butyrat ein signifikanter Anstieg der Rate apoptotischer Zellen gegenüber der Mediumkontrolle ($p < 0,05$). Bei Erhöhung des größeren Kombinationsanteils von 2mM auf 3mM kam es zu einem erneuten, allerdings nichtsignifikanten ($p \geq 0,05$) Anstieg der Rate apoptotischer Zellen. Eine Inkubation mit 2mM Aspirin und 2mM Butyrat ergab nochmals eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) gegenüber den Kombinationen von 2mM Aspirin mit 1mM Butyrat bzw. 1mM Aspirin mit 2mM Butyrat. Die Kombination von 2mM Aspirin und 2mM Butyrat erwies sich also als effektivste Kombination.

APOPTOSEINDUKTION DURCH KOMBINATION VON ASPIRIN UND BUTYRAT AN HT HT-29 / 24h



Graphik 7: Eine Inkubation mit einer Kombination von Aspirin und Butyrat über 24h induziert Apoptose. Die stärksten Effekte ergeben sich für Aspirin 2mM mit Butyrat 2mM und Aspirin 1mM und Butyrat 3mM.

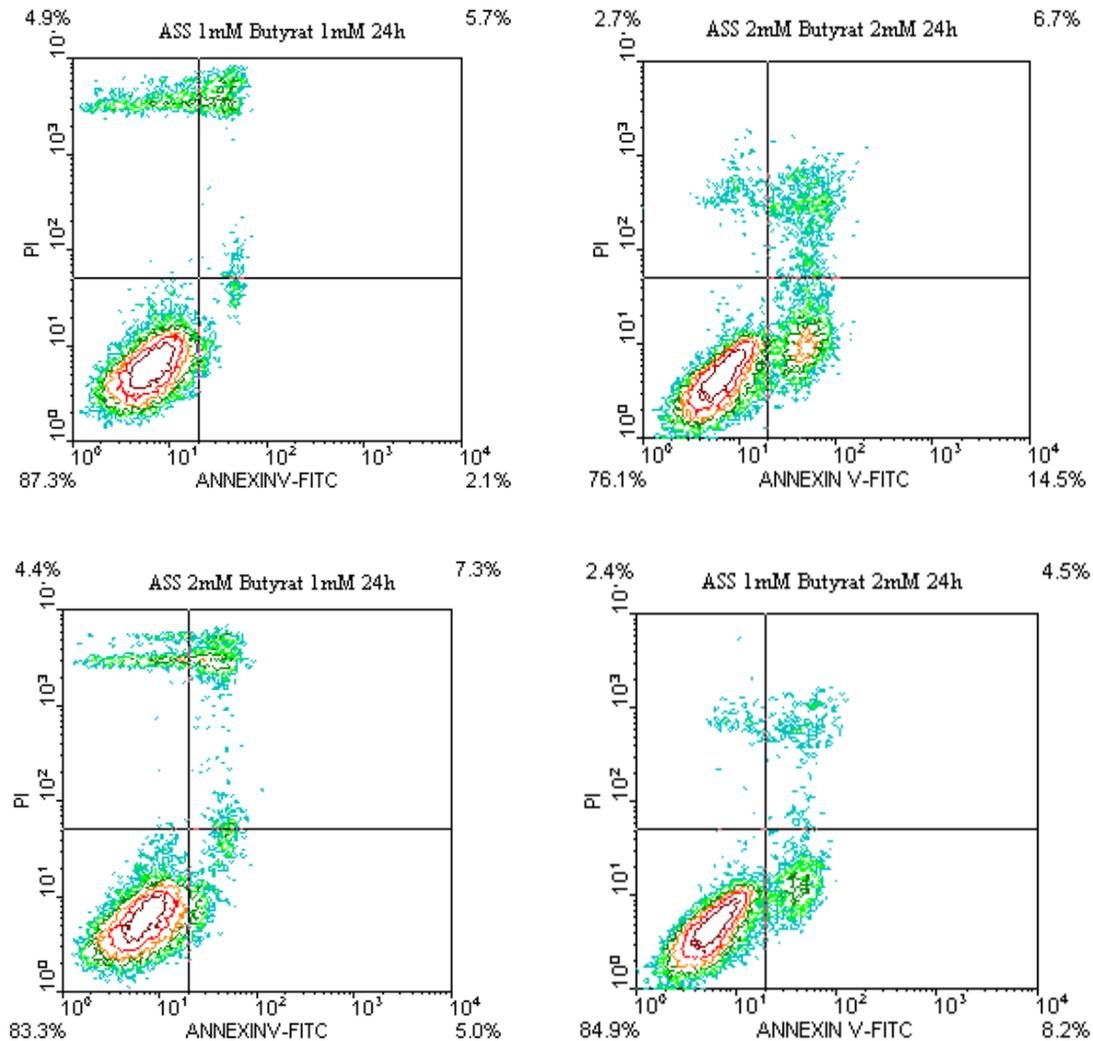
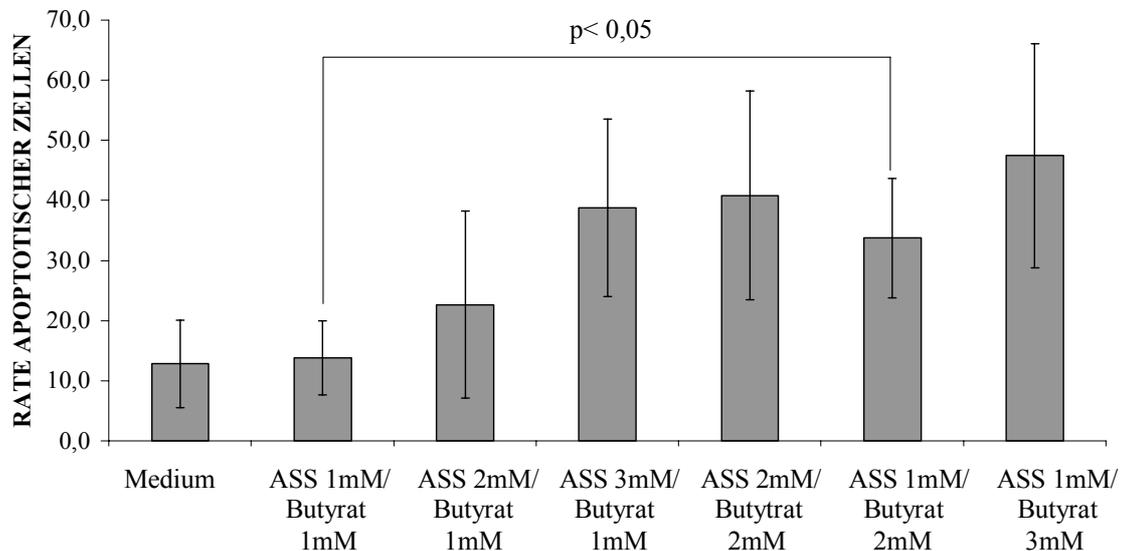


Abbildung 8: Eine Kombination von Aspirin und Butyrat induziert Apoptose in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung. Mit zunehmender Konzentration einer der Substanzen erhöht sich die Rate apoptotischer Zellen, die deutlichsten Effekte wurden mit Aspirin 2mM/Butyrat 2mM erzielt.

Bei einer Inkubationszeit von 48h zeigt eine zunehmende Erhöhung des Aspirinanteils (bis 3mM) keinen signifikanten Effekt auf die Rate apoptotischer Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle. Eine Erhöhung des Butyratanteils auf 2mM resultiert in einem signifikanten Anstieg der Rate apoptotischer Zellen ($p < 0,05$) gegenüber der Mediumkontrolle. Die effektivsten Kombinationen über einen Zeitraum von 48h sind 2mM Aspirin mit 2mM Butyrat bzw. 1mM Aspirin mit 3mM Butyrat (47,4%) ohne einen signifikanten Unterschied beider Kombinationen ($p \geq 0,05$).

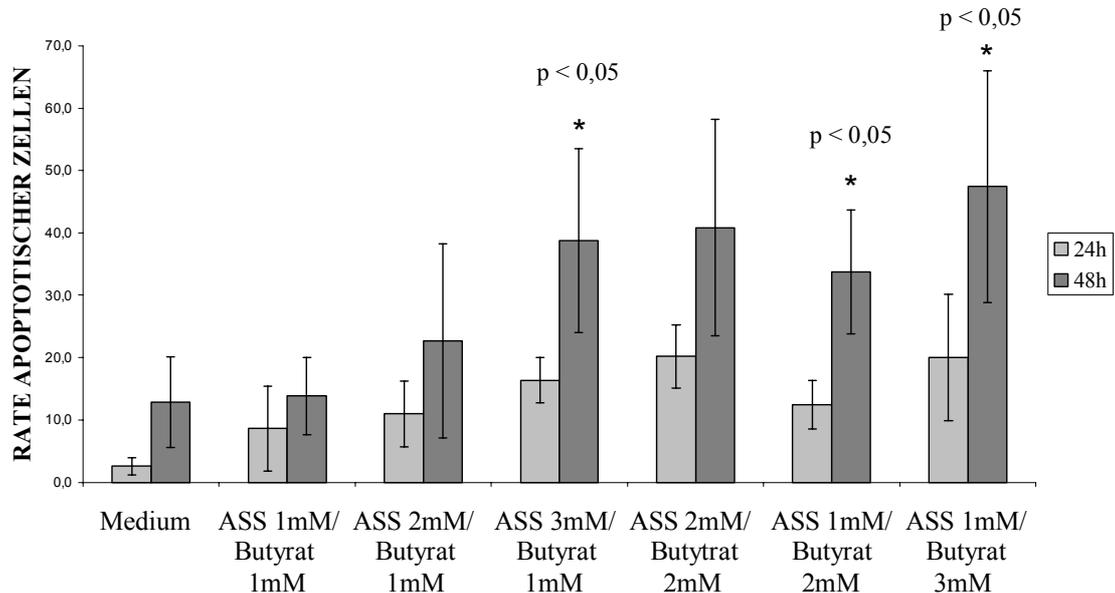
APOPTOSEINDUKTION DURCH KOMBINATION VON ASPIRIN UND BUTYRAT AN HT-29 / 48h



Graphik 7: Eine Inkubation mit einer Kombination von Aspirin und Butyrat über 48h induziert Apoptose. Die ausgeprägtesten Effekte ergeben sich für Aspirin 1mM mit Butyrat 3mM knapp vor Aspirin 2mM mit Butyrat 2mM.

Im zeitlichen Verlauf steigt die Rate apoptotischer Zellen im Zeitraum zwischen 24h und 48h sowohl im Medium als auch unter Inkubation mit 1mM bzw. 2mM Aspirin mit 1mM Butyrat nicht signifikant an. Ab einer Aspirinkonzentration von 3mM kommt es zwischen 24h und 48h zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der apoptotischen Population. Wird die Butyratkonzentration bei 1mM Aspirin auf 2mM bzw. 3mM erhöht kommt es zwischen 24h und 48h zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der Rate apoptotischer Zellen. Der Anstieg der Apoptoserate einer Kombination von 2mM Aspirin und 2mM Butyrat von 24h auf 48h ist nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

**ZEITLICHER VERLAUF DER APOPTOSEINDUKTION DURCH
KOMBINATIONEN VON ASPIRIN UND BUTYRAT AN HT-29**



Graphik 8: Zwischen 24h und 48h steigt die Rate apoptotischer Zellen an. Signifikant ($p < 0,05$, *) ist dieser Anstieg im zeitlichen Verlauf für eine Kombination von 3mM Aspirin mit 1mM Butyrat, 1mM Aspirin mit 2mM und 1mM Aspirin mit 3mM Butyrat.

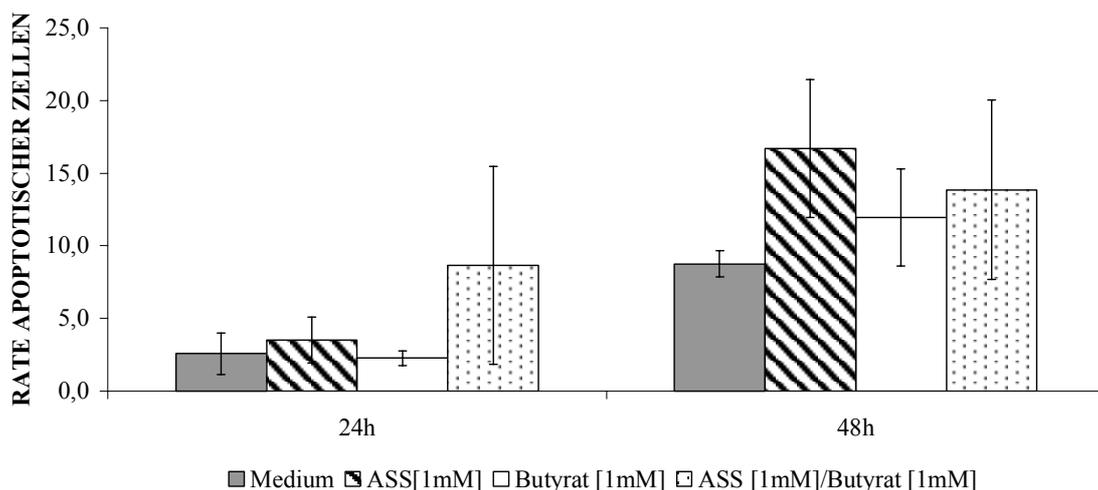
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine kombinierte Inkubation der Zellen mit Aspirin und Butyrat konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Steigerung der Rate apoptotischer Zellen führt, ähnlich wie eine Inkubation mit den Einzelsubstanzen. Nach 24h erwies sich die Kombination von 2mM Aspirin mit 2mM Butyrat als die effektivste Kombination, allerdings ist eine Zunahme für diese Kombination für den Zeitraum zwischen 24h und 48h nicht mehr signifikant. Für verschiedene andere Kombinationen (Aspirin/Butyrat: 3mM/1mM, 1mM/2mM bzw. 3mM) kommt es zwischen 24h und 48h allerdings nochmals zu einer signifikanten Zunahme des apoptotischen Populationsanteils, der Unterschied zwischen diesen Kombinationen und der Kombination 2mM Aspirin mit 2mM Butyrat ist nach 48h nicht mehr signifikant.

Im folgenden soll nun die Apoptoseinduktion der Einzelsubstanzen mit der der entsprechenden Kombinationen verglichen werden, um potentielle Synergismen aufzudecken.

3.1.4 Vergleich der Apoptoseinduktion durch Aspirin und Butyrat gegenüber den Einzelsubstanzen

Bei einer Kombination von 1mM Aspirin und 1mM Butyrat erzielt zwar bereits Aspirin alleine nach 24h einen Anstieg gegenüber der Mediumkontrolle, die Kombination ergibt jedoch keine signifikante Steigerung gegenüber den Einzelsubstanzen ($p \geq 0,05$). Nach 48h zeigt die Kombination einen Rückgang apoptotischer Zellen gegenüber einer alleinigen Behandlung mit Aspirin, jedoch einen Anstieg gegenüber Medium bzw. Butyrat. Diese Veränderungen sind allerdings nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

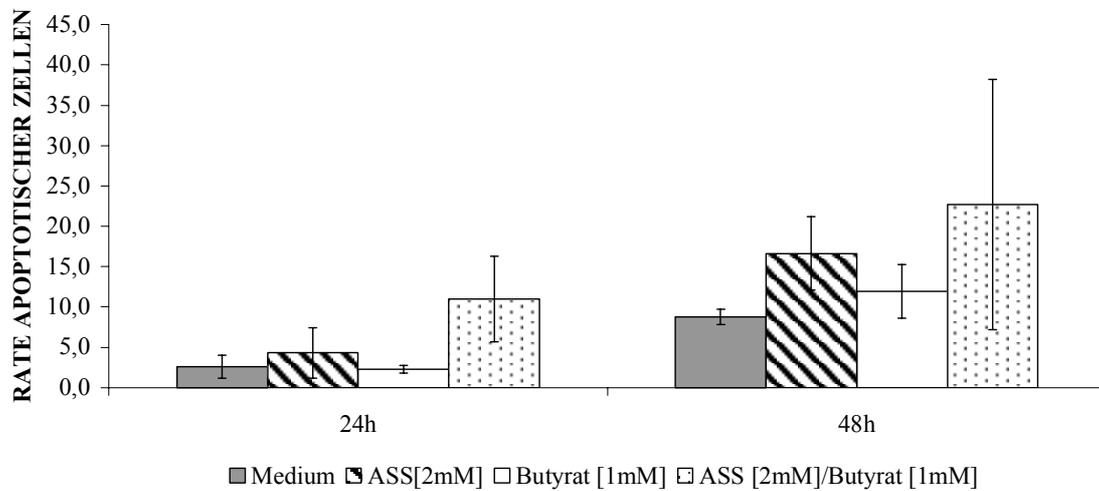
VERGLEICH EINER KOMBINATION VON 1mM ASPIRIN UND 1mM BUTYRAT MIT DEN EINZELSUBSTANZEN



Graphik 9: Die Kombination von 1mM Aspirin mit 1mM Butyrat über 24h resultiert in einem nichtsignifikanten Anstieg gegenüber Mediumkontrolle und den Einzelsubstanzen (8,6% vs. 2,6% bzw. 3,5% (Aspirin)/ 2,3% (Butyrat), $p \geq 0,05$), nach 48h liegt die Rate apoptotischer Zellen nach alleiniger Inkubation mit Aspirin über der der Kombination (16,8% vs. 13,9) und der von Mediumkontrolle ((8,8%) und Butyrat (12,0%), die Veränderungen sind nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

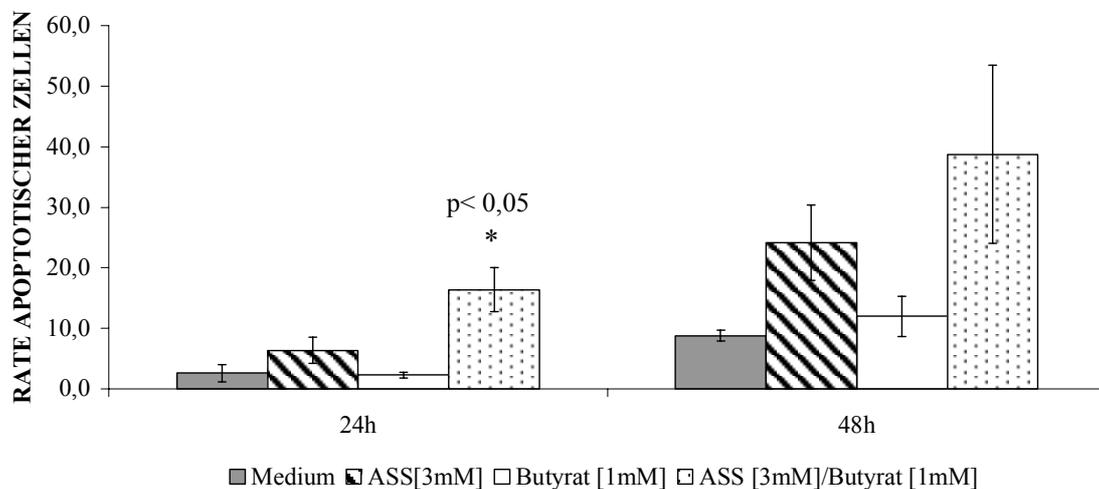
Auch eine Kombination von 2mM Aspirin mit 1mM Butyrat erbrachte weder nach 24h noch nach 48h einen signifikanten ($p \geq 0,05$) Anstieg gegenüber den Einzelsubstanzen.

VERGLEICH EINER KOMBINATION VON 2mM ASPIRIN UND 1mM BUTYRAT MIT DEN EINZELSUBSTANZEN



Graphik 10: Eine Kombination von 2mM Aspirin mit 1mM Butyrat erbringt sowohl nach 24h als auch nach 48h keinen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen gegenüber den Einzelsubstanzen.

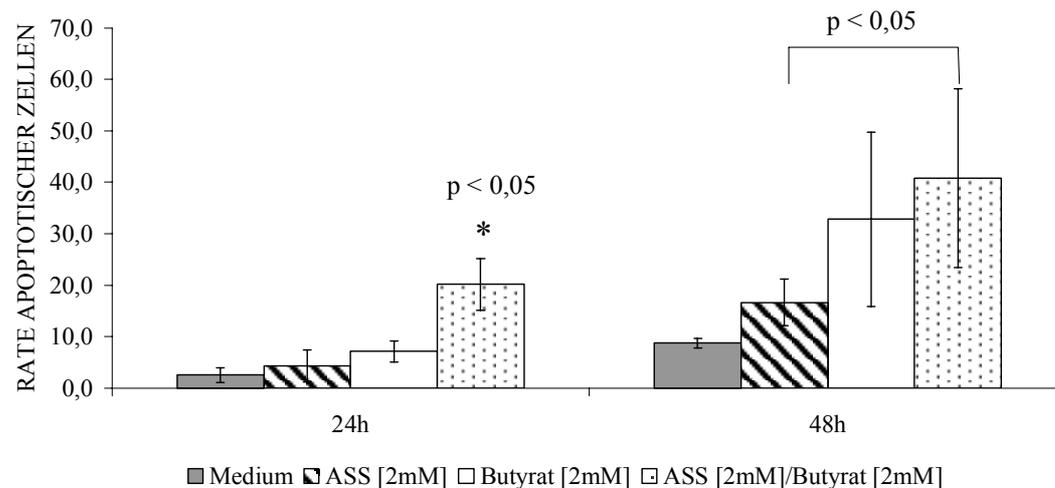
VERGLEICH EINER KOMBINATION VON 3mM ASPIRIN UND 1mM BUTYRAT MIT DEN EINZELSUBSTANZEN



Graphik 11: Eine Kombination von 3mM Aspirin und 1mM Butyrat steigert nach 24h signifikant den Anteil apoptotischer Zellen gegenüber den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$, *), nach 48h ist der Anstieg gegenüber den Einzelsubstanzen nicht mehr signifikant ($p \geq 0,05$).

Behandelt man die Zellen mit einer Kombination von 3mM Aspirin und 1mM Butyrat, kommt es nach 24h zu einem signifikanten Anstieg des apoptotischen Anteils der Population gegenüber den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$). Auch nach 48h ist ein Anstieg gegenüber den Einzelsubstanzen zu beobachten, allerdings nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

VERGLEICH EINER KOMBINATION VON 2mM ASPIRIN UND 2mM BUTYRAT MIT DEN EINZELSUBSTANZEN

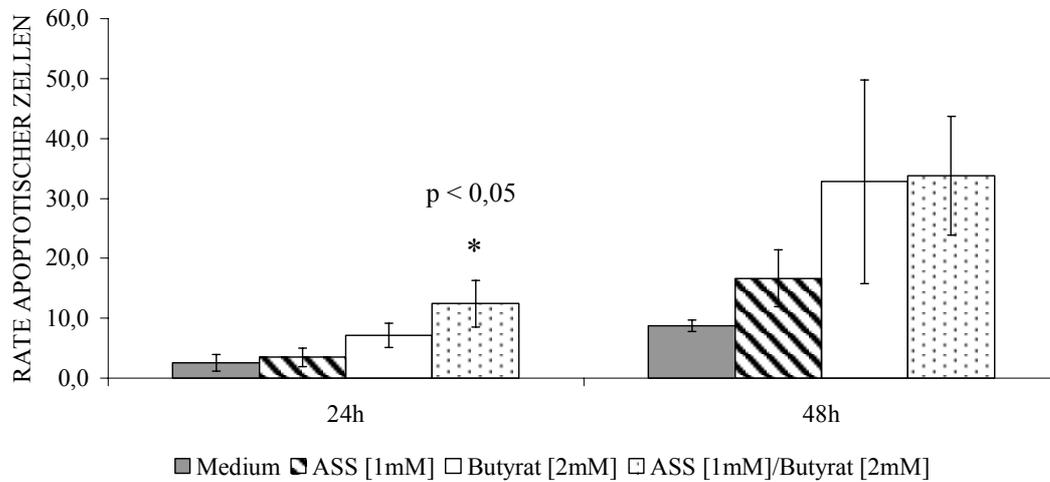


Graphik 12: Nach Behandlung mit einer Kombination von 2mM Aspirin mit 2mM Butyrat ergibt sich nach 24h ein signifikanter Anstieg des apoptotischen Populationsanteils im Vergleich zu den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$). Auch nach 48h ist dieser Kombinationseffekt vorhanden, jedoch nur für Aspirin signifikant ($p < 0,05$).

Auch eine Kombination von 2mM Aspirin mit 2mM Butyrat resultiert nach 24h in einer gegenüber den Einzelsubstanzen signifikant erhöhten Rate apoptotischer Zellen ($p < 0,05$), nach 48h ist dieser Kombinationseffekt noch nachweisbar, allerdings lediglich gegenüber Aspirin signifikant ($p < 0,05$).

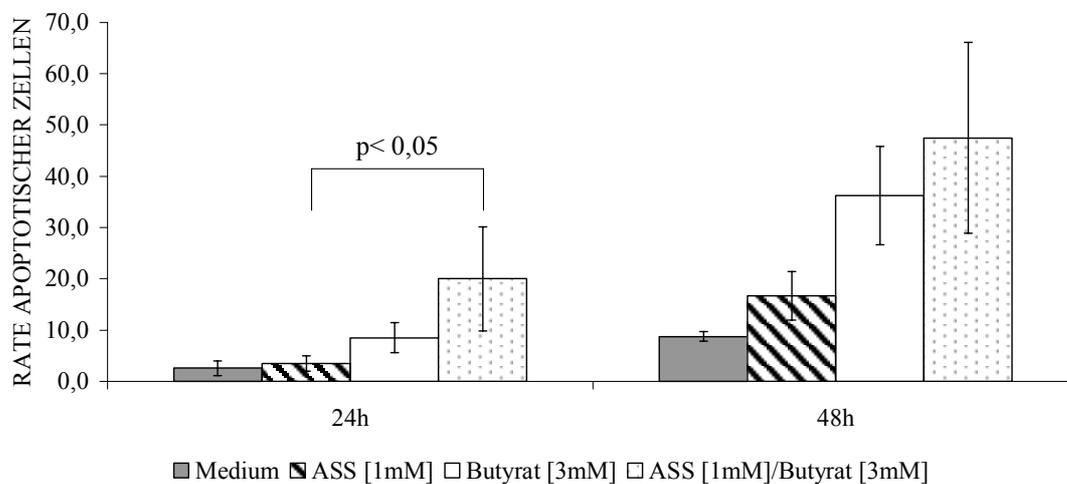
Eine Kombination von 1mM Aspirin mit 2mM Butyrat führt nach 24h zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$), nach 48h ist dieser Effekt nicht mehr signifikant ($p \geq 0,05$).

VERGLEICH EINER KOMBINATION VON 1mM ASPIRIN UND 2mM BUTYRAT MIT DEN EINZELSUBSTANZEN



Graphik 13: Für eine Kombination von 1mM Aspirin mit 2mM Butyrat ergibt sich nach 24h eine signifikante Zunahme gegenüber den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$), dieser Anstieg ist nach 48h nicht mehr signifikant ($p \geq 0,05$).

VERGLEICH EINER KOMBINATION VON 1mM ASPIRIN UND 3mM BUTYRAT MIT DEN EINZELSUBSTANZEN



Graphik 14: Eine Kombination von 1mM Aspirin mit 3mM Butyrat resultiert nach 24h in einer signifikanten Zunahme verglichen mit Aspirin alleine ($p < 0,05$), nicht jedoch gegenüber Butyrat ($p \geq 0,05$). Nach 48h übersteigt die Kombinationswirkung die Einzelsubstanzen nicht mehr signifikant ($p \geq 0,05$).

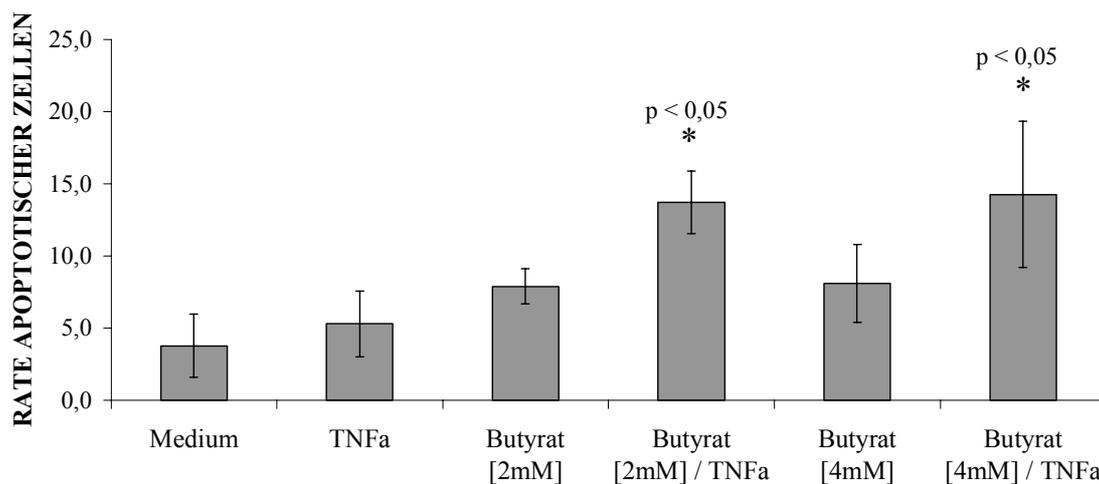
Erhöht man die Konzentration an Butyrat auf 3mM, kommt es nach 24h zwar noch zu einem signifikanten Anstieg gegenüber Aspirin ($p < 0,05$), der Anstieg gegenüber

Butyrat ist allerdings nicht mehr signifikant ($p \geq 0,05$). Nach 48h übertrifft die Kombination zwar noch die Einzelsubstanzen, jedoch nicht mehr signifikant ($p \geq 0,05$). Es lässt sich zusammenfassend also feststellen, daß ein synergistischer Effekt, i.e. eine signifikante Steigerung gegenüber den Einzelsubstanzen nur für bestimmte Konzentrationen (3mM Aspirin/1mM Butyrat, 2mM Aspirin/2mM Butyrat, 1mM Aspirin/2mM Butyrat,) nachweisbar ist und auch hier nur für einen Inkubationszeitraum von 24h.

3.2 Vergleich der apoptotischen Wirkung von Butyrat und TNF α mit einer Kombination der Einzelsubstanzen an HT-29 Zellen

Eine Inkubation mit TNF α (500U/ml) über 12h ergibt keine signifikante Zunahme ($p \geq 0,05$) der Rate apoptotischer Zellen gegenüber der Mediumkontrolle, auch eine Behandlung mit Butyrat erzielt in beiden Konzentrationen (2mM bzw. 4mM) keinen signifikanten Effekt ($p \geq 0,05$). Kombiniert man TNF α mit Butyrat kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose gegenüber den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$).

APOPTOSEINDUKTION DURCH TNF α UND BUTYRAT AN HT-29 / 12h



Graphik 15: Eine Stimulation von HT-29 mit TNF α [500U/ml] zeigt keine signifikante Änderung der Rate apoptotischer Zellen ($p \geq 0,05$), Butyrat führt zu keiner signifikanten Zunahme ($p < 0,05$), eine Koinkubation mit TNF α und Butyrat sorgt für einen signifikanten Anstieg gegenüber den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$, *).

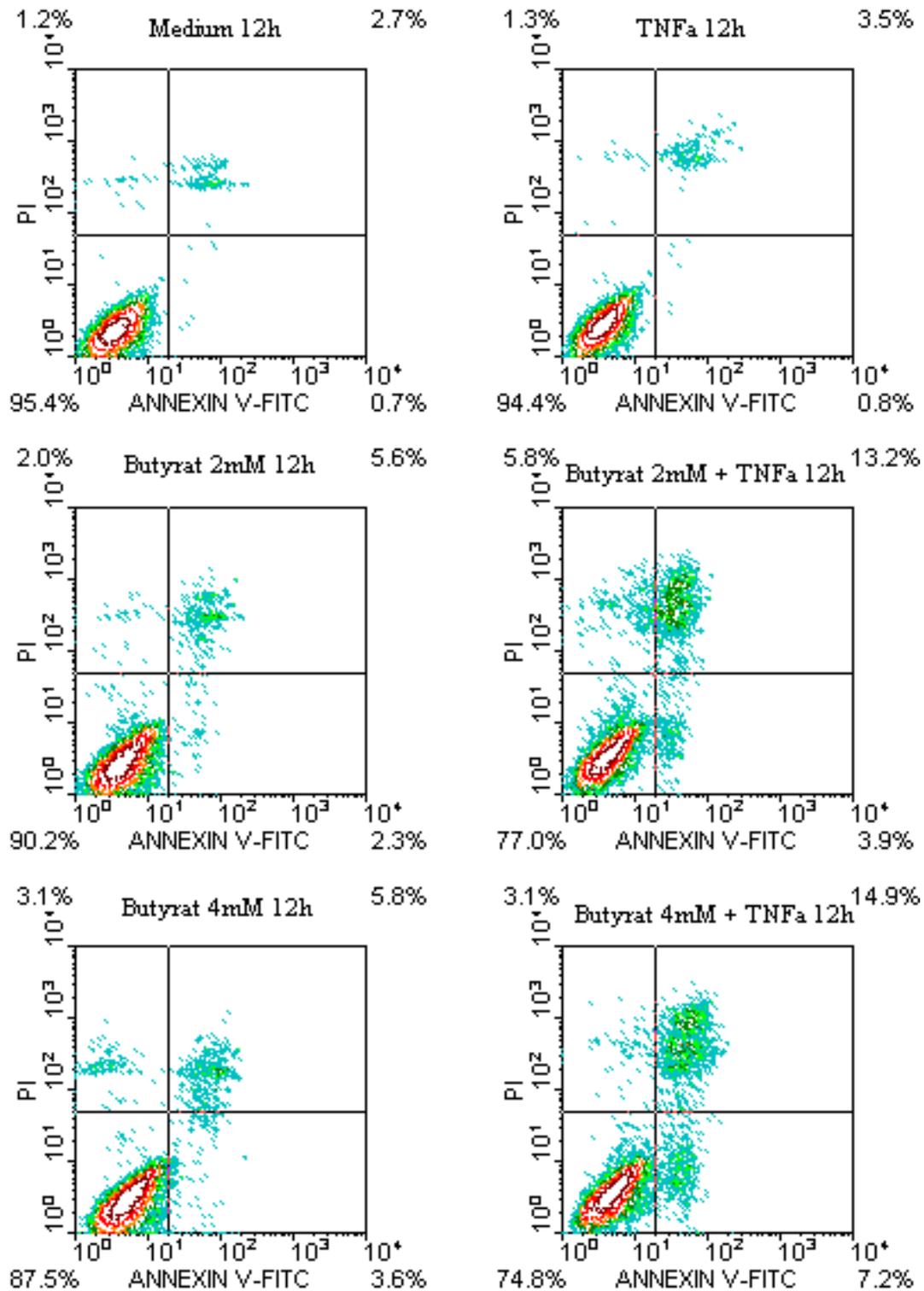
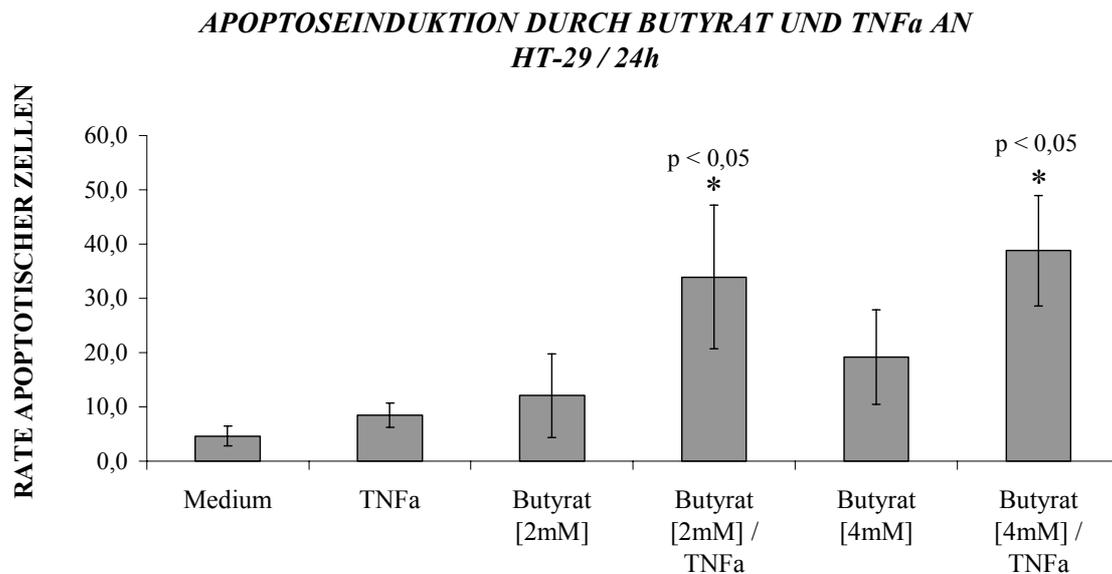


Abbildung 9: Während eine Inkubation mit TNF α [500U/ml] über 12h keinen Effekt zeigt, kommt es unter einer Behandlung mit Butyrat zu einer geringen Zunahme der Rate apoptotischer Zellen, eine Koinkubation mit TNF α steigert diese deutlich.

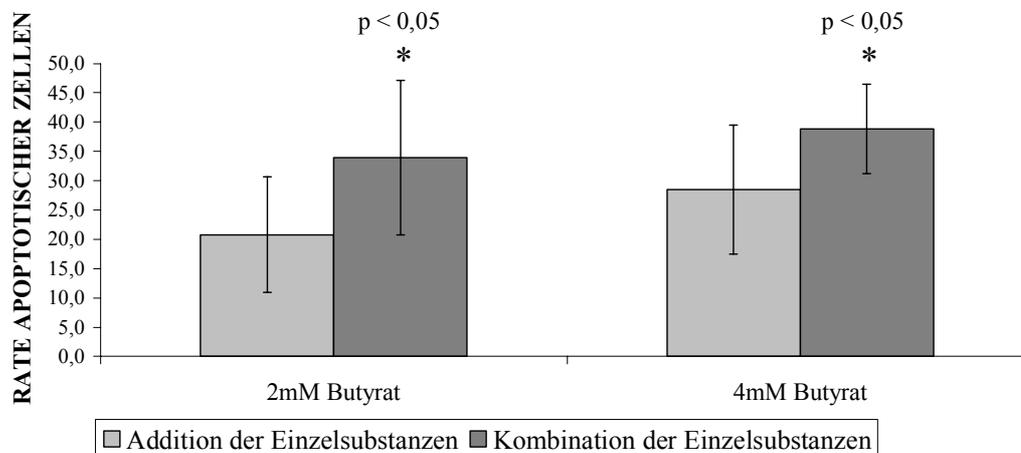
Auch nach 24h ist die Erhöhung der Rate apoptotischer Zellen durch $\text{TNF}\alpha$ gering, aber signifikant ($p < 0,05$), eine Behandlung mit 4mM Butyrat resultiert ebenfalls in einer signifikant erhöhten Rate apoptotischer Zellen. Eine Kombination von Butyrat und $\text{TNF}\alpha$ führt zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der Wirkung der Einzelsubstanzen ($p < 0,05$).



Graphik 16: Nach 24h bewirkt eine Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ [500U/ml] nur eine geringe, jedoch signifikante Zunahme der Rate apoptotischer Zellen ($p < 0,05$), eine Konzentration von 4mM Butyrat führt ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme ($p < 0,05$), die Zunahme von 2mM Butyrat ist nicht signifikant ($p \geq 0,05$), eine Kombination von $\text{TNF}\alpha$ mit Butyrat resultiert in einem signifikanten Anstieg gegenüber den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$, *).

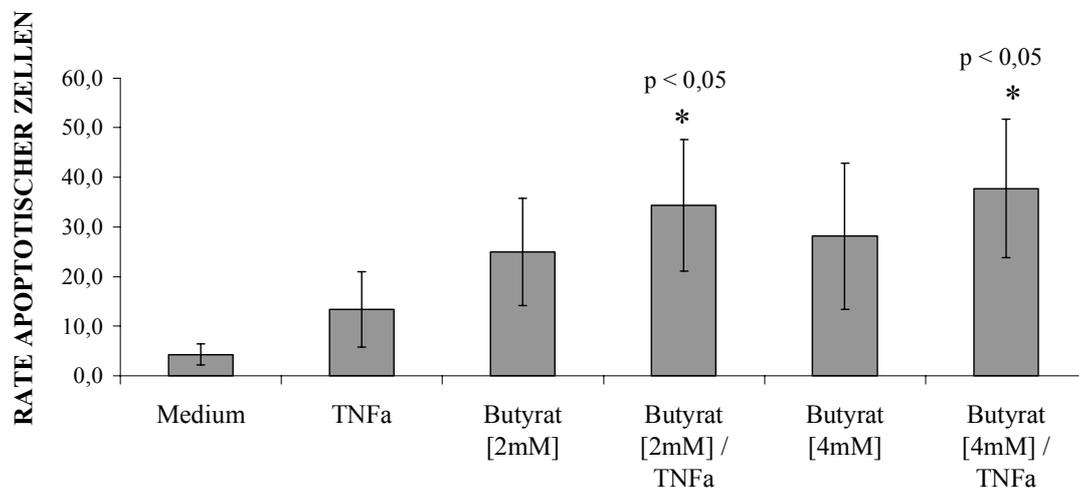
Die Rate apoptotischer Zellen nach Inkubation mit der Kombination von Butyrat und $\text{TNF}\alpha$ über 24h übersteigt sogar signifikant ($p < 0,05$) die Summe der Apoptoseraten der Einzelsubstanzen.

SYNERGISTISCHER EFFEKT EINER KOMBINATION VON TNF α UND BUTYRAT AN HT-29 / 24h



Graphik 17: Die Rate apoptotischer Zellen nach einer Koinkubation mit Butyrat und TNF α [500U/ml] übersteigt die Summe apoptotischer Zellen der Einzelsubstanzen signifikant (Butyrat [2mM]: 34,0% vs. 20,8%, $p < 0,05$, *; Butyrat [4mM] 38,8% vs. 28,4%, $p < 0,05$, *).

APOPTOSEINDUKTION DURCH BUTYRAT UND TNF α AN HT-29 / 36h



Graphik 18: Nach 36h kommt es sowohl unter TNF α [500U/ml] als auch unter 2mM bzw. 4mM Butyrat zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen ($p < 0,05$). Eine Koinkubation von TNF α mit Butyrat führt zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose (Butyrat 2mM: $p < 0,05$, *; Butyrat 4mM: $p < 0,05$, *).

Eine Inkubation der Zellen über 36h führt sowohl für TNF α als auch für Butyrat zu einer signifikanten Zunahme gegenüber der Mediumkontrolle ($p < 0,05$), eine Koinkubation von TNF α mit Butyrat sorgt für eine signifikante Zunahme gegenüber TNF α bzw. Butyrat alleine (Butyrat 2mM: $p < 0,05$; Butyrat: 4mM $p < 0,05$). Im Gegensatz zu 24h erreicht die Zunahme weder für 2mM noch für 4mM Butyrat die Summe der Einzelsubstanzen.

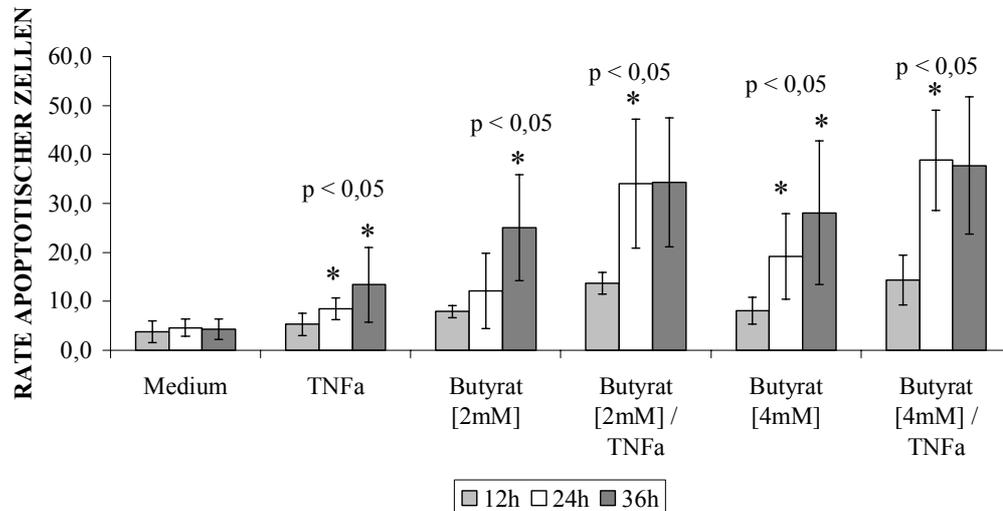
Über den Zeitraum von 12h bis 36h findet man in der Mediumkontrolle keine signifikante Zunahme der Rate apoptotischer Zellen. Unter TNF α kommt es sowohl von 12h auf 24h als auch von 24h auf 36h zu einer signifikanten Zunahme ($p < 0,05$).

Auch die Wirkung von Butyrat zeigt eine zeitliche Zunahme: Unter 2mM Butyrat ist die Zunahme zwischen 12h und 24h nicht signifikant ($p \geq 0,05$), zwischen 24h und 36h signifikant ($p < 0,05$), für 4mM Butyrat findet sich sowohl zwischen 12h und 24h als auch von 24h auf 36h ein signifikanter Anstieg des apoptotischen Populationsanteils ($p < 0,05$).

Für eine Kombination von TNF α und 2mM bzw. Butyrat ergibt sich von 12h auf 24h ein signifikanter Anstieg des apoptotischen Anteils ($p < 0,05$), von 24h auf 36h ergibt sich nur noch ein geringer nichtsignifikanter Anstieg ($p \geq 0,05$) für Butyrat 2mM bzw. ein nichtsignifikanter Rückgang ($p \geq 0,05$) für 4mM.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Rate apoptotischer Zellen einer Kombination von Butyrat und TNF α im Zeitraum zwischen 12h und 36h die Rate der Einzelsubstanzen signifikant übertrifft, wobei TNF α nach 12h noch nicht in der Lage ist, eine signifikante Apoptose auszulösen. Nach 24h übertrifft die Apoptoserate der Kombination sogar signifikant eine theoretische Summe der Einzelsubstanzen. Zwischen 24h und 36h kommt es unter Kombinationsbehandlung zu keiner Zunahme der Apoptose mehr, im Gegensatz dazu kommt es unter den Einzelsubstanzen nochmals zu einer signifikanten Zunahme, die jedoch das Niveau der Kombination immer noch nicht erreicht.

**ZEITLICHER VERLAUF DER APOPTOSEINDUKTION DURCH
BUTYRAT UND TNF α AN HT29**

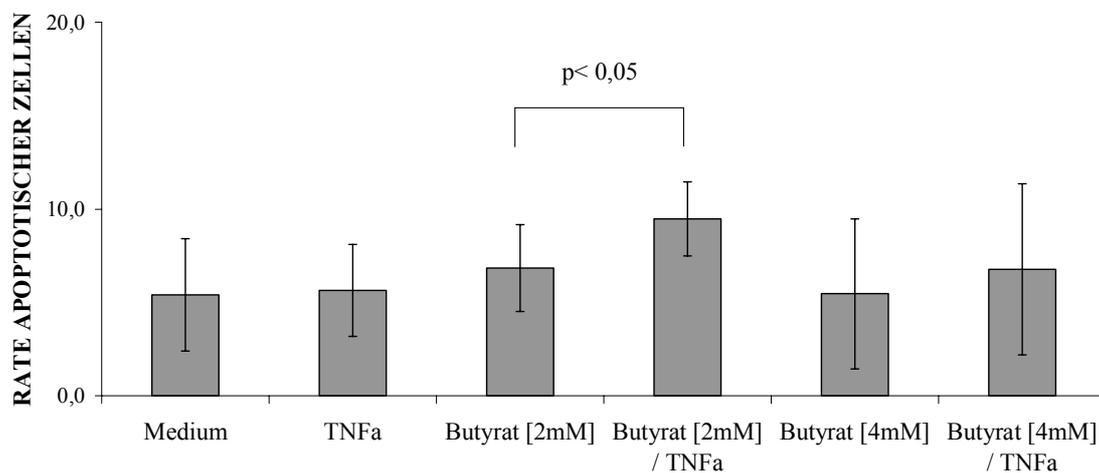


Graphik 19: In der Mediumkontrolle kommt es zwischen 12h, 24h und 36h zu keinen signifikanten Änderungen im apoptotischen Anteil. Nach Stimulation mit TNF α [500U/ml] steigt die Rate apoptotischer Zellen zwischen 12h und 24h bzw. zwischen 24h und 36h signifikant an ($p < 0,05$, *). Unter 2mM Butyrat steigt die Rate apoptotischer Zellen zwischen 12h und 24h nichtsignifikant an ($p \geq 0,05$), zwischen 24h und 36h signifikant ($p < 0,05$, *). Unter 4mM Butyrat erhöht sich der apoptotische Populationsanteil sowohl zwischen 12h und 24h als auch zwischen 24h und 36h signifikant ($p < 0,05$, *). Bei einer Kombination von TNF α und 2mM Butyrat nimmt der Anteil apoptotischer Zellen zwischen 12h und 24h signifikant ($p < 0,05$, *) zu, zwischen 24h und 36h ist die Zunahme nicht mehr signifikant ($p \geq 0,05$). Für eine Kombination von TNF α mit 4mM Butyrat ergibt sich von 12h auf 24h ein signifikanter Anstieg der Rate apoptotischer Zellen ($p < 0,05$, *), von 24h auf 36h kommt es zu einem nichtsignifikanten Rückgang ($p \geq 0,05$).

3.3 Vergleich der apoptotischen Wirkung einer Kombination von TNF α und Butyrat mit einer Kombination der Einzelsubstanzen an SW620 Zellen

Inkubiert man nun SW620 Zellen mit TNF α (500U/ml) und Butyrat (2mM, 4mM) alleine oder in Kombination für 12h, so erfolgt durch Behandlung mit den Einzelsubstanzen keine signifikante Steigerung der Rate apoptotischer Zellen gegenüber dem Medium, die Kombination steigert lediglich für 2mM Butyrat mit TNF α die Rate apoptotischer Zellen signifikant gegenüber 2mM Butyrat alleine.

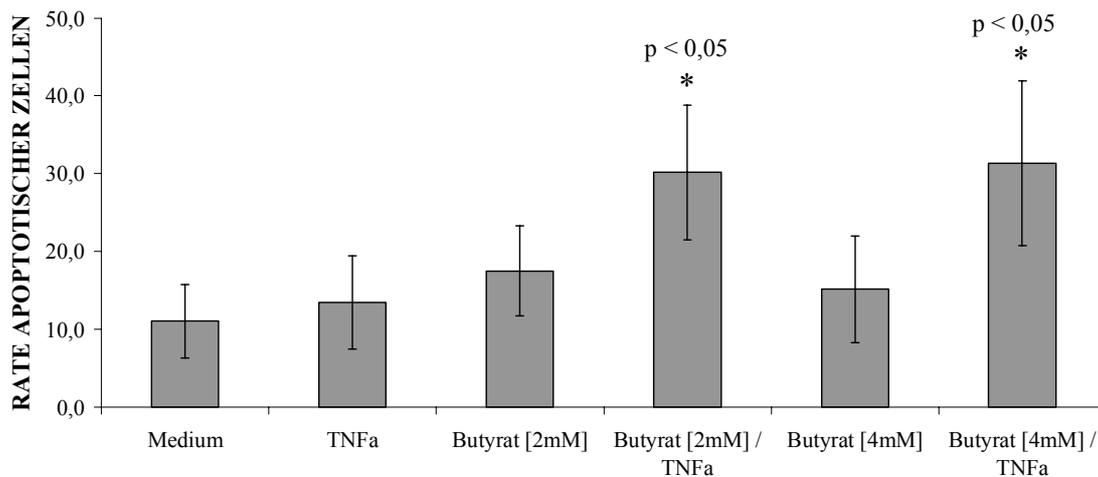
APOPTOSEINDUKTION DURCH EINE KOMBINATION TNF α UND BUTYRAT AN SW620 / 12h



Graphik 20: Eine Inkubation der Zellen über einen Zeitraum von 12h mit TNF α [500U/ml], 2mM bzw. 4mM Butyrat oder einer TNF α /Butyrat-Kombination hat kaum Effekte auf die Entwicklung des apoptotischen Anteils an der Gesamtpopulation.

Nach einer Inkubationszeit von 24h steigt der Anteil apoptotischer Zellen sowohl unter 2mM und 4mM Butyrat als auch nach Stimulation mit TNF α signifikant gegenüber der Mediumkontrolle an, eine Koinkubation von Butyrat und TNF α ergibt eine signifikante Zunahme gegenüber den Einzelsubstanzen.

**APOPTOSEINDUKTION DURCH EINE KOMBINATION VON TNF α
UND BUTYRAT / 24h**



Graphik 21: Nach 24h Behandlung mit TNF α [500U/ml], 2mM bzw. 4mM Butyrat oder einer TNF α /Butyrat-Kombination steigt sowohl die Rate apoptotischer Zellen unter den Einzelsubstanzen gegenüber der Mediumkontrolle signifikant an ($p < 0,05, *$) als auch unter der Kombination gegenüber den Einzelsubstanzen ($p < 0,05, *$).

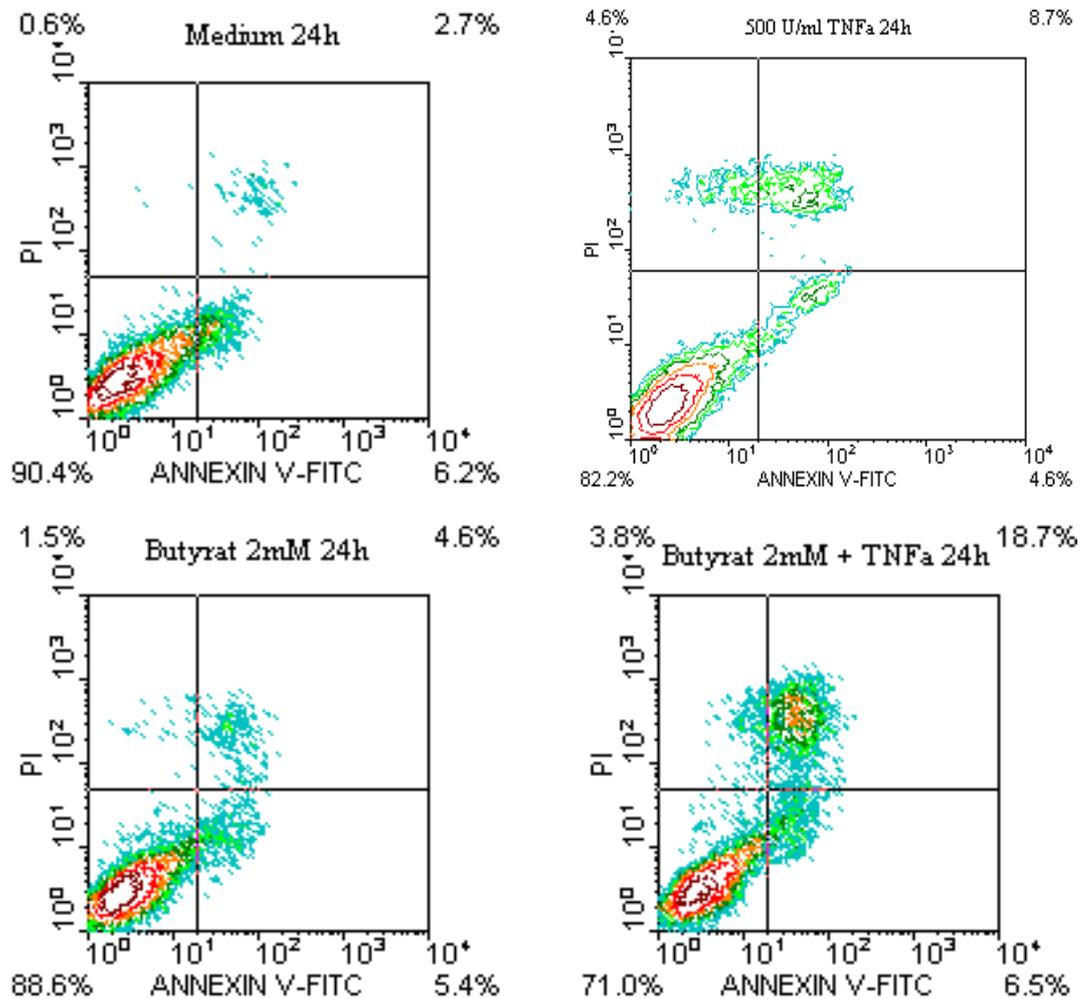
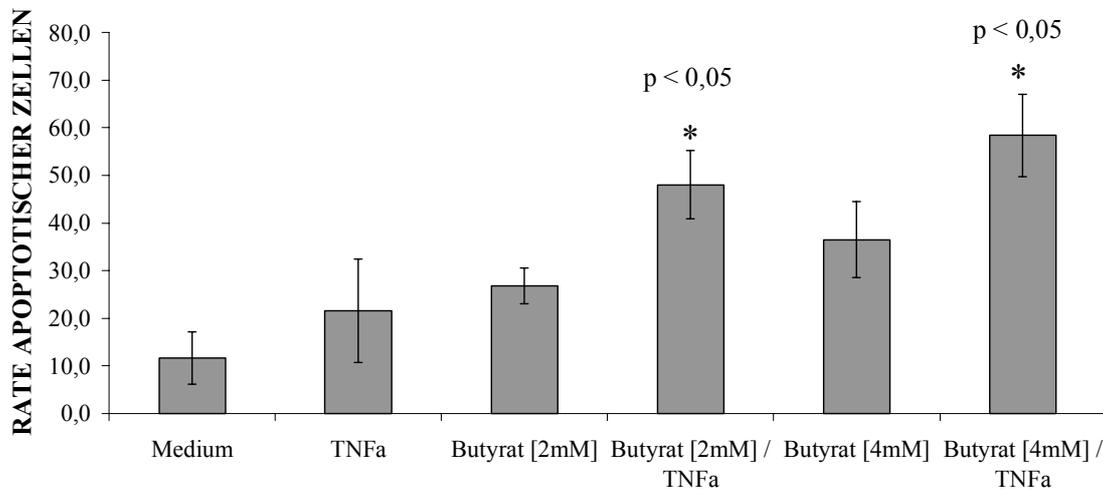


Abbildung 10: Nach Inkubation mit TNF α [500U/ml] über 24h zeigt sich ein sichtlicher Effekt, unter Behandlung mit Butyrat kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Rate apoptotischer Zellen, eine Koinkubation mit TNF α steigert diese nochmals.

Nach 36h Inkubation nimmt die Rate apoptotischer Zellen sowohl für Butyrat als auch TNF α signifikant gegenüber der Mediumkontrolle ($p < 0,05$) zu. Eine Koinkubation mit TNF α und 2mM bzw. 4mM Butyrat führt dann wiederum zu einem signifikanten Anstieg gegenüber den Einzelsubstanzen.

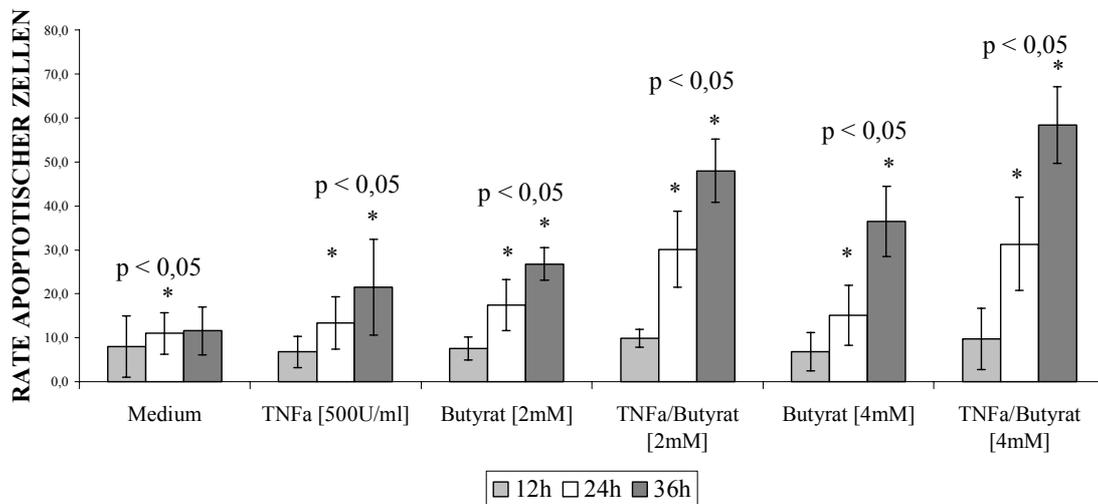
**APOPTOSEINDUKTION DURCH EINE KOMBINATION VON TNF α
UND BUTYRAT / 36h**



Graphik 22: Nach 36h Inkubation mit TNF α , 2mM bzw. 4mM Butyrat steigt der Anteil apoptotischer Zellen gegenüber der Mediumkontrolle signifikant an ($p < 0,05$). Eine Koinkubation sorgte nochmals für einen signifikanten Anstieg gegenüber den Einzelsubstanzen ($p < 0,05$, *).

Betrachtet man nun die Entwicklung der Rate apoptotischer Zellen im zeitlichen Verlauf, kommt es in der Mediumkontrolle zwischen 12h und 24h zu einer signifikanten Zunahme der Spontanapoptose ($p < 0,05$), zwischen 24h und 36h kommt es zu keiner signifikanten Änderung ($p \geq 0,05$). Für TNF α kommt es sowohl zwischen 12h und 24h als auch zwischen 24h und 36h zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen ($p < 0,05$). Auch eine Inkubation mit Butyrat resultiert in einem zeitabhängig signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen ($p < 0,05$). Ebenso kommt es unter einer Kombinationsbehandlung zeitabhängig zu einem signifikanten Anstieg der Rate apoptotischer Zellen ($p < 0,05$) gegenüber den Einzelsubstanzen.

**ZEITLICHER VERLAUF DER APOPTOSEINDUKTION DURCH
BUTYRAT UND TNF α AN SW620**



Graphik 23: Zwischen 12h und 24h kommt es in der Mediumkontrolle zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen ($p < 0,05$, *), zwischen 24h und 36h ergibt sich faktisch keine Änderung. Nach Stimulation mit TNF α steigt der Anteil apoptotischer Zellen sowohl von 12h auf 24h als auch von 24h auf 36h signifikant an ($p < 0,05$, *). Eine Inkubation mit 2mM Butyrat resultiert in einem signifikanten zeitabhängigen Anstieg der Rate apoptotischer Zellen, ebenso eine Inkubation mit 4mM Butyrat ($p < 0,05$, *) Unter einer Kombination von TNF α und 2mM Butyrat nimmt der Anteil apoptotischer Zellen zeitabhängig signifikant zu ($p < 0,05$, *), ebenso bei einer Kombination von TNF α und 4mM Butyrat ($p < 0,05$, *).

Faßt man nun die Ergebnisse einer Inkubation von SW620 mit TNF α , Butyrat oder einer Kombination dieser Substanzen zusammen, kann man feststellen, daß für Inkubationszeiten von 24h und 36h eine Kombination von Butyrat und TNF α die apoptotische Wirkung der Einzelsubstanzen signifikant übertrifft. Außerdem kommt es für alle Substanzen zeitabhängig zwischen 12h und 36h zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose.

3.4 EMSA und Supershift zur Überprüfung der NF- κ B-Aktivierung durch TNF α unter Butyrateinfluß

Da eine Kombination von Butyrat mit TNF α zu einer Steigerung der Rate apoptotischer Zellen gegenüber den Einzelsubstanzen führt, wurde im folgendem die Auswirkung von Butyrat auf den Aktivierungsstatus von NF- κ B als einem entscheidenden intrazellulären Ziel von TNF α untersucht. Wie bereits erwähnt kann TNF α sowohl pro- als auch anti-apoptotisch auf seine Zielzelle wirken. NF- κ B wurde bereits als entscheidender Transkriptionsfaktor entzündlicher Gene bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen identifiziert, und Butyrat kann deren klinisches Bild und ihren Verlauf positiv beeinflussen. Des Weiteren werden durch NF- κ B neben pro-inflammatorischen auch anti-apoptotische Gene beeinflusst. Es bleibt also zu untersuchen, ob auch die gesteigerte Rate apoptotischer Zellen mit einer Beeinflussung von NF- κ B assoziiert ist.

Zur Untersuchung des Zusammenwirkens von Butyrat und TNF α auf den programmierten Zelltod in kolorektalen Karzinomzellen wird im EMSA die nukleäre Bindung der einzelnen NF- κ B-Untereinheiten untersucht. Voraussetzung für diese Bindung ist eine nukleäre Translokation der NF- κ B-Untereinheiten. Findet diese Translokation nicht statt, kann im EMSA keine nukleäre Bindung nachgewiesen werden, i. e. eine durch NF- κ B als Transkriptionsfaktor vermittelte Genexpression kommt nicht zustande.

Für den EMSA wurden SW620 Zellen - entweder nach Vorinkubation mit 4mM Butyrat für 24h bzw. 48h oder unvorbehandelt - mit TNF α in einer Aktivität von 2.000U/ml für 30 Minuten stimuliert. Aus den Zellen wurden Kernextrakte präpariert, diese mit einem ³²P-markierten NF- κ B-Oligonukleotid inkubiert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

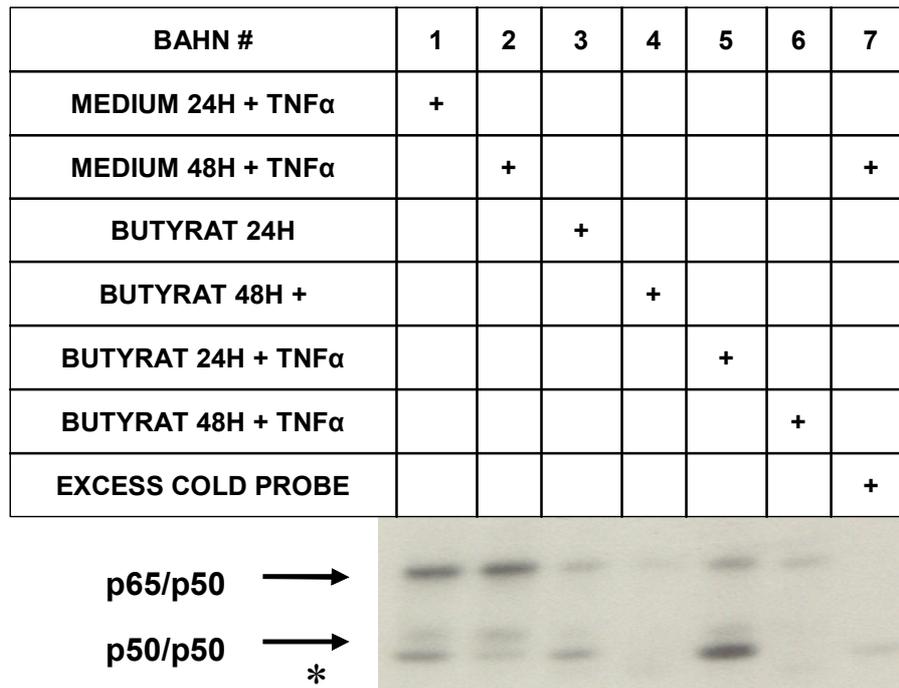


Abbildung 11: EMSA nur mit TNF α stimulierter (1, 2), nur mit Butyrat vorinkubierter (3, 4) oder erst vorinkubierter und dann stimulierter (5, 6) SW620 Zellen. Eine Präinkubation mit Butyrat inhibiert deutlich die durch Stimulation mit TNF α vermittelte Bindung p65/p50-Heterodimers bereits nach 24h, nach 48h Butyrat wird auch die Bindungsaktivität des p50/p50-Homodimers inhibiert.

Nach einer Stimulation mit TNF α werden zwei spezifische Banden deutlich sichtbar (Pfeile links, in den Bahnen 1, 2, 5, 6). Die dritte Bande im EMSA (links mit * markiert) entsteht durch unspezifische Bindung, sie ist auf den Überschuss einer nicht mit ^{32}P markierten Probe hin nicht mehr nachweisbar (Bahn 7).

Um die Bestandteile der spezifischen Bahnen näher zu differenzieren, wurde ein Supershift EMSA nur mit TNF α stimulierten Zellen durchgeführt, i.e. Kernextrakten und Oligonukleotid wurde jeweils noch ein spezifischer Antikörper gegen die einzelnen NF- κ B-Untereinheiten beigelegt. Die obere Bande repräsentiert hauptsächlich das p65/p50 Heterodimer (Bahnen 9, 12), nach längerer Exposition gegenüber dem entsprechenden Antikörper läßt sich darüber hinaus ein cRel/p50 Heterodimer (Bahn 10) nachweisen.

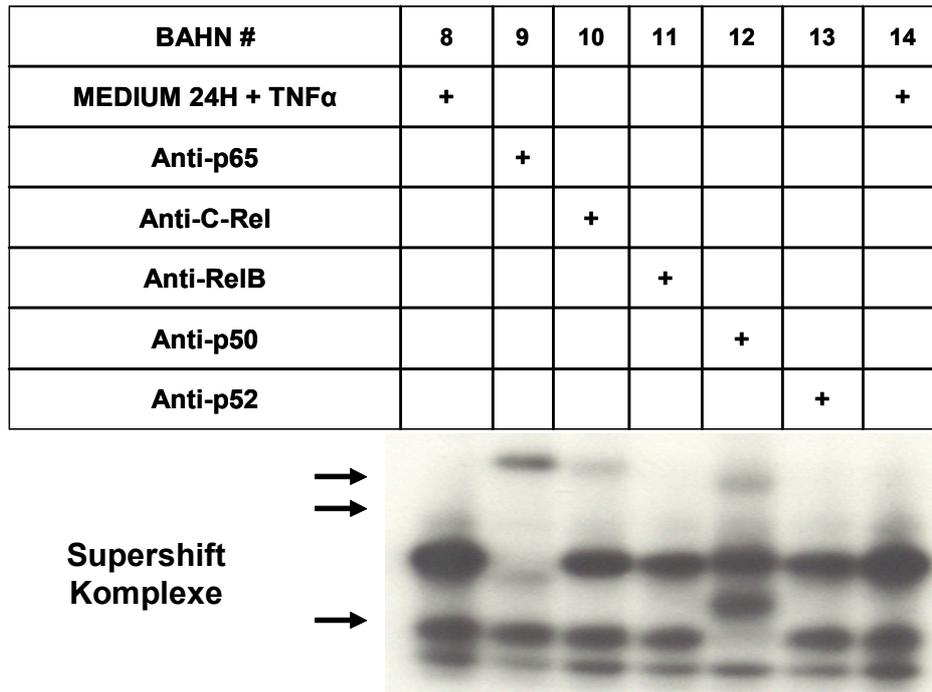


Abbildung 12: Ein super-shift EMSA für Zellen nach 24h Medium und anschließender Stimulation mit TNF α . Es zeigt sich deutlich, daß der links mit p65/p50 markierte Komplex deutlich sowohl mit dem Antikörper gegen p65 als auch gegen p50 reagiert, der mit p50/p50 markierte Komplex ebenso deutlich nur mit dem Antikörper gegen p50.

Die schwächere untere Bande im EMSA repräsentiert ein p50 Homodimer (Bahn 12). Der p50-Antikörper zeigt im Supershift eine deutliche Reaktion, sowohl mit der oberen Bande, die durch das p65/p50-Heterodimer hervorgerufen wird, als auch mit der schwächeren unteren Bande, die durch DNA-Bindungsaktivität eines p50/p50-Homodimers hervorgerufen wird (Bahn 12). Die Antikörper gegen Rel-B (Bahn 11) und gegen p52 (Bahn 13) zeigen auch nach längerer Inkubationszeit keine spezifische Bindung.

Butyrat in einer Konzentration von 4mM alleine zeigt nach 24h eine reduzierte DNA-Bindung des p65/p50-Komplexes, jedoch nicht des p50/p50-Homodimers (Bahn 3). Nach 48h Inkubation mit 4mM Butyrat ist keine DNA-Bindung des p65/p50-Heterodimers mehr nachweisbar (Bahn 4). Werden die Zellen nach einer Vorinkubation mit Butyrat für 24h ebenfalls mit TNF α stimuliert, kommt es zu einer deutlichen Reduktion des p65/p50-Komplexes (Bahn 5) gegenüber den nicht mit Butyrat vorinkubierten Zellen (Bahn 1). Der Effekt wird durch eine Verlängerung der Vorbehandlung mit Butyrat auf 48h noch verstärkt (Bahn 5, 6).

Während die Behandlung mit Butyrat über 24h die DNA-Bindung des p50/p50-Homodimers nicht weiter beeinflusst, verhindert eine Präinkubation mit Butyrat über 48h die Bindungsaktivität des p50/p50-Komplexes (Bahn 2, 6).

Es zeigt sich also, daß eine Behandlung kolorektaler Karzinomzellen, hier exemplarisch SW620 Zellen, mit Butyrat zu einer deutlichen Inhibition der NF- κ B-Aktivität (p65/p50 und p50/p50) nach TNF α -Stimulation führt.

3.5 RPA zur Prüfung der Modulation NF- κ B-abhängiger antiapoptotischer Faktoren durch Butyrat

Um die biologische Relevanz der im EMSA gezeigten Inhibition der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B (p65-RelA/p50 and p50/p50) zu überprüfen, soll der Einfluß auf die mRNA-Transkription der NF- κ B abhängigen anti-apoptotischen Faktoren TRAF1/2 (TNF α receptor associated factors 1/2) und c-IAP-1/-2 und XIAP (inhibitor of apoptosis proteins) durch einen multiprobe RNase Protection Assay untersucht werden. Die Transkription sowohl von TRAF1/2 als auch von c-IAP-1/-2 wird durch NF- κ B als Transkriptionsfaktor aktiviert. TRAF1/2 und IAP-1/-2 blockieren die TNF α -vermittelte Aktivierung von Caspase-8. Caspase-8 startet die Kaskade der Caspasen und beginnt damit den Weg der Zelle in die Apoptose.

In SW620 Zellen ist mRNA weder für TRAF1/2 noch für c-IAP-1/-2 und XIAP detektierbar (Bahn 3). Nach 24h ist weder nach Stimulation mit TNF α in einer Aktivität von 500U/ml noch nach Inkubation mit Butyrat in einer Konzentration von 2mM und 4mM oder nach einer Kombination der Substanzen eine mRNA-Induktion für TRAF1/2, c-IAP-1/-2 oder XIAP nachweisbar (Bahn 4-8).

TNF α receptor associated factor 4 (TRAF4) mRNA ist in SW620 Zellen nachweisbar (Bahn 3). Auch für TRAF4 ist nach 24h weder durch TNF α noch durch Butyrat oder durch eine Kombination der Substanzen eine Änderung der mRNA-Expression nachweisbar (Bahn 4-8).

Testosterone-repressed prostate message 2 (TRPM2) war in SW620 Zellen nicht nachweisbar. Sowohl Butyrat in einer Konzentration von 2mM und 4mM als auch eine Kombination von Butyrat mit $\text{TNF}\alpha$ konnten eine mRNA-Expression von TRPM2 induzieren (Bahn 5-8). Auf Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ in einer Aktivität von 500U/ml war ebenfalls für TRPM2 keine mRNA-Induktion nachweisbar (Bahn 4).

Für NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CRAF (CD40 receptor associated factor 1) und XIAP war in SW620 Zellen weder ein basaler mRNA-Level nachweisbar (Bahn 3), noch kam es nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (Bahn 4) oder Inkubation mit Butyrat (Bahn 5 und 7) zu einer mRNA-Expression. Eine Kombination der Substanzen zeigte ebenfalls keine nachweisbare mRNA (Bahn 6 und 8).

Eine Verlängerung der Expositionszeiten zeigte für alle Faktoren keine Veränderung in der mRNA-Expression.

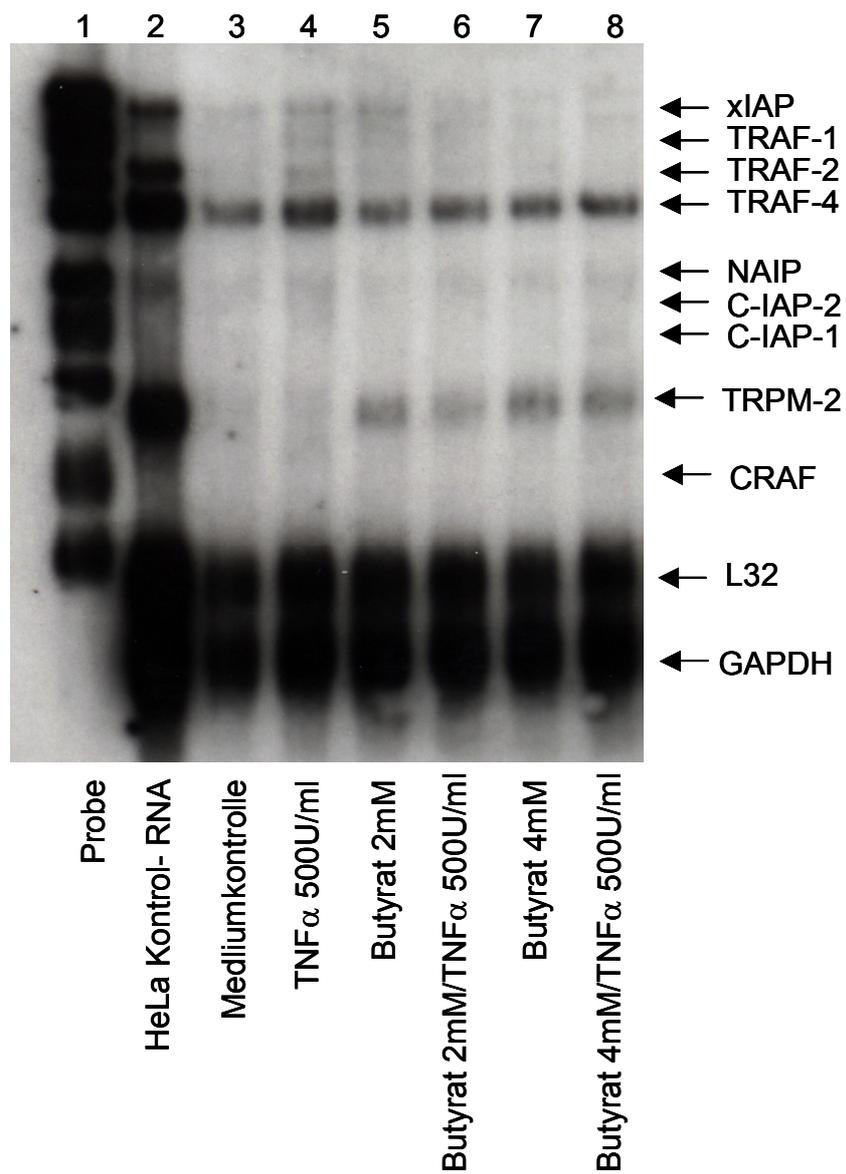


Abbildung 13: RPA von SW620 Zellen zur Prüfung der Auswirkung von TNF α [500U/ml] und 2mM bzw.4mM Butyrat auf die mRNA-Expression der anti-apoptotischen, NF- κ B-abhängigen Faktoren TRAF1/2 und IAP-1/-2. Weder für TRAF1/2 noch für c-IAP-1/-2 läßt sich eine Änderung auf mRNA-Ebene nachweisen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von Aspirin und TNF α auf die durch Butyrat induzierte Apoptose in kolorektalen Karzinomzelllinien mittels eines durchflußzytometrischen Annexin V-Propidiumjodid-Assays untersucht. Aspirin wurde auf Grund seiner, bereits epidemiologisch beschriebenen [42, 47], präventiven Wirkung gegenüber dem Kolonkarzinom gewählt, Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) als Zytokin, dessen apoptotische Wirkung auf Kolonozyten in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus bzw. der Aktivierbarkeit des nukleären Faktors κ B bereits beschrieben wurde [90]. Der Annexin V-Propidiumjodid-Assay wurde gewählt, da er Unterscheidung und Quantifizierung frühapoptotischer, spätapoptotischer und nekrotischer Zellen ermöglicht.

Bereits 1993 zeigten Hague et al. [91], daß Butyrat in kolorektalen Karzinomzelllinien Apoptose induziert. Zum Nachweis wurde DNA-Laddering verwendet, eine sichere, allerdings schwer zu quantifizierende Methode. In den folgenden Jahren wurden von verschiedenen Gruppen die Einflüsse von Butyrat auf unterschiedliche Faktoren der Apoptose untersucht wie bax [29, 92], bak [92-94] und Aktivierung von Caspase 3 [22, 93-96] oder die Spaltung der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP-Cleavage) [93, 94] als einer der ersten Effekte der Caspase-3-Aktivierung.

Ein methodisches Problem, daß all diesen Studien gemeinsam ist, ist die schwierige Quantifizierbarkeit der apoptotischen Wirkung. Zum Teil wurden nur biologische Endpunkte der Apoptose betrachtet wie die nukleäre Kondensation, die durch DNA-Laddering nachgewiesen wird. Allerdings werden so die frühen Stadien der Apoptose übersehen, da DNA-Strangbrüche ein spätes Ereignis in der Apoptose darstellen und in der adhären Population kolorektaler Karzinomzellen kaum nachweisbar sind, sondern vielmehr eine Eigenschaft der abgelösten, flottierenden Zellen darstellen [87]. Andere Methoden wie eine Änderung des Verhältnisses von pro- und anti-apoptotischen Proteinen stellen nur einen Ausschnitt inmitten der komplexen Signalwege der Apoptose dar und sind so ebenfalls zu einer Quantifizierung nur mäßig geeignet.

Um dieses Problem zu lösen, bieten sich Methoden wie die Durchflußzytometrie an. Auch hier existieren unterschiedliche Ansätze zum Apoptosenachweis: Ein sicheres Zeichen der Apoptose sind DNA-Strangbrüche, wie sie als DNA-Laddering im Agarosegel nachgewiesen werden können. Diese Strangbrüche lassen sich

durchflußzytometrisch im TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick-end labeling)-Assay nachweisen, allerdings finden diese Strangbrüche im Ablauf der Apoptose eher spät statt [86], so daß bei kolorektalen Karzinomzellen die Apoptose der adhärenen Zellen damit nicht nachgewiesen werden kann [87]. In frühen Phasen ist für kolorektale Karzinomzellen noch kein Apoptosenachweis mit TUNEL möglich. Alternativ bietet sich hier der Nachweis mit Annexin V an. Dieses bindet an Phosphatidylserin, das im Rahmen der Apoptose an die Außenseite der Zellmembran gelangt. Diese Externalisation von Phosphatidylserin ist bereits deutlich vor dem Zeitpunkt nachweisbar, an dem durch den TUNEL-Assay DNA-Strangbrüche detektierbar werden [86], speziell bei der Untersuchung adhärenter Epithelzellen [87]. Außerdem ist es möglich, durch Gegenfärbung mit Propidiumjodid frühe und späte Phasen der Apoptose zu unterscheiden. Es ist also eine separate Betrachtung frühapoptotischer Zellen, die nur mit Annexin V färben, und spätapoptotischer Zellen, die auf Grund zunehmend permeabler Zellmembran auch mit Propidiumjodid anfärben, möglich.

Andere Methoden wie der Nachweis von Verschiebungen des mitochondrialen Membranpotentials [92] oder die Aktivierung von Caspase-Kaskaden sind prinzipiell ebenfalls sehr gut geeignet, allerdings nur auf einzelne Abschnitte der Signalketten gerichtet, die letztlich zur nukleären Kondensation im Rahmen der Apoptose führen. Hier liegt wiederum der klare Vorteil des Annexin V-Assays, da die Externalisation von Phosphatidylserin unabhängig von den anderen Mechanismen der Apoptose quasi als Begleiteffekt abläuft. In vivo dient diese Externalisation zur Anlockung von Makrophagen, die apoptotische Zellen eliminieren sollen.

Wie Butyrat hemmt auch Aspirin die Proliferation kolorektaler Karzinomzelllinien und induziert in diesen Apoptose [60]. Auffällig bei der Aspirin induzierten Apoptose ist das mehrfach beschriebene Fehlen des „DNA-Laddering“ als Folge der DNA-Strangbrüche [58, 60] oder eine offensichtlich zytotoxische Wirkung in höheren Dosen [57].

Gemeinsam ist Butyrat und Aspirin die Erhöhung von Bak [67, 94] und die Aktivierung von Caspase-3 [22, 60, 93], wobei bestimmte Folgen von Caspase-3 wie PARP-Degradation und DNA-Fragmentierung bei Aspirin nicht festzustellen sind [60]. Durch dieses Fehlen der DNA-Fragmentierung ist auch hier der Apoptosenachweis mittels eines Annexin V-Assays gegenüber dem TUNEL vorzuziehen.

Auf Grund der aufgezeigten Problematik der einzelnen anderen Methoden haben wir uns in dieser Arbeit für den Annexin V-Propidiumjodid-Assay entschieden.

Sowohl Aspirin als auch Butyrat induzieren - wie in der Arbeit gezeigt - zeit- und dosisabhängig Apoptose in der humanen kolorektalen Karzinomzelllinie HT-29 [97]. Den Verdacht einer protektiven Wirkung von NSAID gegenüber dem Kolonkarzinom haben mehrere Tiermodelle [53-55] und epidemiologische Studien [42-47] unterstützt, gleiches gilt auch für Butyrat, sowohl für Tiermodelle [9, 23, 31, 32, 98-100] als auch für epidemiologische Studien [8, 33, 101].

Aspirin führt bereits nach 24h ab einer Konzentration von 4mM zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen, nach 48h ab einer Konzentration von 3mM. Ab einer Konzentration von 1mM Aspirin kommt es zwischen 24h und 48h zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen, während die Rate apoptotischer Zellen in der Mediumkontrolle keinen signifikanten Zuwachs verzeichnet. Hier zeigt sich bereits der Vorzug des Annexin V-Propidiumjodid-Assays. Eine ähnliche Untersuchung mit dem TUNEL-Assay zeigte bei Qiao et al. erst nach 72h Inkubation mit 3mM vergleichbare Werte [58]. Allerdings berichten Castano et al. [60] von atypischer Apoptose durch Aspirin in HT-29 mit fehlenden DNA-Strangbrüchen und nicht nachweisbarer PARP-Proteolyse. Die in dieser Studie [60] verwendeten Aspirinkonzentrationen (5mM, 7,5mM, 10mM) liegen zwar sehr hoch, jedoch ist der Effekt für 5mM Aspirin mit einem Anteil von ca. 12-13% apoptotischen Zellen in ähnlicher Größenordnung wie in unseren eigenen Untersuchungen. Subbegoowa et al. [57] sprechen sogar von Nekrose, da bei ihnen keine frühapoptotische Population nachweisbar war. Im allgemeinen zeigen sich jedoch in der Literatur vergleichbare Daten, wenn sich auch durch differente Methodik Unterschiede in Dosis und Inkubationszeiten für vergleichbare Raten apoptotischer Zellen ergeben [58, 60, 97, 102]. Da aus dem Kreis der NSAID sowohl Stoffe, die Cyclooxygenase-2 inhibieren [24, 67, 103], als auch solche, die diese nicht inhibieren [67], eine ähnliche apoptotische Wirkung wie Aspirin haben, könnte man annehmen, daß zumindest ein Teil der Aspirinwirkung Cyclooxygenase-2 unabhängig vermittelt wird. Ähnliche Effekte zeigen sich auch für andere Enzyme aus dem Bereich des Arachnoidonsäuremetabolismus wie die Lipoxygenasen [104, 105].

Ähnlich wie Aspirin führt Butyrat bereits nach 24h ab einer Konzentration von 5mM zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen. Chai et al. [22] konnten in LIM1215 Zellen ebenfalls nach 24h für 4mM Butyrat eine signifikante Apoptoseinduktion zeigen, jedoch über die Bestimmung eines sub-G₁-Peaks. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 24h auf 48h führt nochmals zu einer Zunahme apoptotischer Zellen, signifikant ist dieser Zuwachs allerdings erst ab einer Konzentration von 4mM.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den ersten Daten von Banard et al. [106], die einen reduzierte Zellzahl nach 48h und 5mM Butyrat beschreiben, mit den Beobachtungen von Heerdt et al., nach denen Tributyrin bereits nach 16h in SW620 Zellen einen sub-G₁-Peak in der Zellzyklusverteilung, ein Zeichen fortgeschrittener Apoptose zeigt, [107] wird die Bandbreite der Beobachtungen an Butyrat deutlich. Die Beobachtungen von Heerdt et al. [107] bestätigten sich auch durch einen signifikanten Verlust des Membranpotentials nach 16h unter 4mM Butyrat [93]. McBain et al. zeigten Unterschiede in der Empfindlichkeit der kolorektalen Karzinomzelllinien HCT 116 und VACO 5 gegenüber Butyrat induzierter Apoptose [108]. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine signifikante Zunahme der Rate apoptotischer Zellen ab einer Konzentration von 4-5mM Butyrat für einen Inkubationszeitraum zwischen 16h und 24h auftritt. Die Ergebnisse in dieser Arbeit stimmen mit den aufgezeigten Daten der Literatur überein, auch in unseren Untersuchungen ist nach 12h Inkubationszeit mit 4mM Butyrat keine signifikante Apoptoseinduktion festzustellen, nach 24h Inkubation mit Butyrat ist die Rate apoptotischer Zellen gegenüber der Mediumkontrolle signifikant erhöht. Das Verhältnis des apoptotischen Anteils zur Gesamtpopulation schwankt zwar innerhalb der Studien, jedoch bleiben innerhalb der einzelnen Arbeiten Konzentration und Inkubationszeit für einen signifikanten Effekt bei verschiedenen Methoden konstant. Diese Schwankungen sind wohl am ehesten auf Unterschiede in den Kulturbedingungen wie Anzahl der ausgesäten Zellen, Mediumzusammensetzung u.ä. zurückzuführen. Ein quantitativer Vergleich absoluter Werte zwischen den in dieser Arbeit gezeigten Daten und den variierenden Daten der Literatur gestaltet sich zwar schwierig, jedoch sind die Ergebnisse bezüglich Wirkkonzentration und -zeitraum (4mM und 24h) für einen signifikanten Effekt qualitativ durchaus vergleichbar.

Eine Kombination von Aspirin und Butyrat induziert ebenso wie die Einzelsubstanzen Apoptose. In einem Zeitraum bis zu 24h führen gewisse Kombinationen

(Aspirin/Butyrat: 3mM/1mM, 2mM/2mM, 1mM/2mM) zu einer signifikanten Steigerung der Rate apoptotischer Zellen gegenüber den Einzelsubstanzen [97]. Eine Zunahme zeigt sich sowohl nach 24h als auch nach 48h, wobei nach 48h keine signifikante Zunahme gegenüber den Einzelsubstanzen mehr zu finden ist. Der additive Effekt der Aspirin-Butyrat-Kombination auf die Rate apoptotischer Zellen ist also im Gegensatz zu den Effekten der Einzelsubstanzen nicht zeitabhängig. Die möglichen Mechanismen für die gezeigte additive Wirkung von Butyrat und Aspirin auf die Apoptose kolorektaler Karzinomzelllinien sind bislang noch wenig untersucht. Einen möglichen Erklärungsansatz geben Giardina et al. [109] durch den Nachweis einer Erhöhung freier Sauerstoffradikale durch Aspirin und Butyrat in HT29. Crew et al. [24] beschreiben einen ähnlichen additiven Effekt auf die Apoptose für die Kombination von 2mM Butyrat und 10µM NS-398, einem spezifischen COX-2-Inhibitor. Eine Erklärung wäre hier, die Hemmung der Cyclooxygenase-2, die in den meisten kolorektalen Karzinomen verstärkt exprimiert ist. Butyrat erhöht deren Expression und handelt damit evtl. seiner eigenen apoptotischen Wirkung entgegen. Eine Hemmung der Cyclooxygenase-2 über einen Cyclooxygenase-Inhibitor würde dann eine erhöhte Rate apoptotischer Zellen erlauben.

Der Apoptose induzierende Effekt von Aspirin und Butyrat tritt nicht in relativ kurzer Zeit wie durch Bindung von Zytokinen auf, sondern benötigt eine gewisse Vorlaufzeit, wodurch anzunehmen ist, daß der programmierte Zelltod durch Proteinneusynthese vermittelt wird [22, 60, 67, 93, 94].

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt für die Erklärung der proapoptotischen Wirkung von Aspirin und Butyrat ist die Bildung freier Sauerstoffradikale [109], die u.a. auch zu einer Sensibilisierung für TNF α und Fas durch eine Vorinkubation mit Aspirin und Butyrat führen soll [109, 110], wobei sowohl die Oberflächenexpression der Fas-Rezeptoren als auch die Expression von FADD unverändert bleibt [110]. Allerdings ist Butyrat in der Lage, die Expression von Fas und Fas-Ligand auf normalen Mauskolonozyten parallel zur Apoptoseinduktion zu erhöhen, die Apoptose kann dann auch durch antagonistisches lösliches Fas (Fas:Fc) inhibiert werden [111].

	Aspirin	Butyrat
Proliferation	↓	↓
Differenzierung (AP, CEA)	-	↑
Apoptose		↑ [30, 96, 98]
Bcl-Superfamilie (Proteinebene)	↑ bak [67]	- bak [110] ↑ bax [29, 92], ↑ bak [94]
Änderung des mitochondrialen Membranpotentials		↑ [27, 92, 93]
Cytochrom c-shift		↑ [92]
Caspasen-Aktivierung	↑ [60]	↑ [22, 93-96]
PARP-Proteolyse	- [60]	↑ [92, 94]
DNA-Fragmentierung	- [60]	↑ [28, 91, 96]
Fas (Proteinebene)		↑ [27]
Fas-Ligand (Proteinebene)		↑ [27]
Zellzyklusarrest		↑ [22]
DNA-Hyperacetylierung		↑ [108, 112]
Shedding (Lösen der Zellen von der Wand der Kulturflasche)		↑ [18, 28]
c-myc (Proteinebene)		↓ [21, 29, 106]
Il-8 (Proteinebene)		↑ [34]
COX-2 (Proteinebene)		↑ [24]

Tabelle 1: Zusammenfassende Darstellung der Literaturdaten zu Apoptose und Zellzyklus durch Aspirin und Butyrat

Insgesamt läßt sich feststellen, daß eine Kombination von Aspirin und Butyrat in der richtigen Zusammensetzung durchaus in der Lage ist, in kolorektalen Karzinomzelllinien den Anteil Rate apoptotischer Zellen gegenüber den Einzelsubstanzen zu erhöhen – sicher jedoch nur ein Aspekt der protektiven Wirkung beider Substanzen gegenüber der Entstehung kolorektaler Karzinome.

Ganz anders als bei Butyrat oder Aspirin ist die Induktion von Apoptose durch Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) eine im Ablauf bekannte Signalkaskade: Die Bindung von TNF α an TNFR-1 führt zytoplasmatisch zur Anlagerung von TRADD, wodurch zwei differente Signalkaskaden ausgelöst werden: Interaktion von TRADD mit FADD und CRADD aktiviert Caspase-2 und Caspase-8. Nachfolgend aktiviert Caspase-8 Caspase-3, führt damit zur Degradation von PARP, dadurch zur DNA-Fragmentierung und zur Apoptose [69-72].

Andererseits interagiert TNF α via TRADD auch mit TNFR-2 [69, 71], aktiviert damit NIK und dadurch IKK und führt so zur Phosphorylierung und nachfolgender Degradation von I κ B α . Diese erlaubt, daß NF- κ B aktiviert wird und in den Kern transloziert, wodurch anti-apoptotische Gene transkribiert werden [68]. Der überwiegende Anteil der NF- κ B-Dimere besteht aus RelA (p65) und NF- κ B1 (p50) oder NF- κ B2 (p52) Untereinheiten. In den in der Arbeit untersuchten Kolonkarzinomzellen resultierte eine Stimulation mit TNF α in einer deutlichen NF- κ B-Aktivierung. Ein Supershift-EMSA für NF- κ B ergab ein Vorliegen sowohl eines p65/p50 Hetero- und als auch eines p50/p50 Homodimers. Die Ausprägung der jeweiligen weiteren intrazellulären Wege von TNF α entscheidet über Überleben oder Apoptose. Eine Inhibition des antiapoptotischen Weges führt zu einer Steigerung der Rate apoptotischer Zellen [68, 71, 113-121].

Inwieweit Butyrat auf diese Signalkaskaden beeinflussend wirkt, ist bislang nicht in vollem Umfang verstanden. Eine Vorinkubation von SW620 Zellen mit Butyrat für 24h bzw. 48h zeigt in unserer Arbeit auf eine Stimulation mit TNF α hin im EMSA eine signifikante Inhibition der nukleären Translokation von NF- κ B, genauer gesagt, eine signifikante Reduktion der nukleären Bindungsaktivität des p65/p50-Dimers [122]. Die Erhöhung der Rate apoptotischer Zellen ist also im EMSA mit einer Inhibition der Aktivierung von NF- κ B assoziiert.

Butyrat selbst kann zur Degradation von I κ B α führen [123], woraus eine Aktivierung von NF- κ B resultieren müßte. Andere Autoren bestätigen zwar die Reduktion von I κ B α durch Butyrat alleine, zeigen allerdings, daß aus einer Vorinkubation mit Butyrat eine verminderte Aktivierung bzw. Translokation von NF- κ B resultiert [26, 39, 75, 122, 124]. Auch inhibiert eine Vorinkubation mit Butyrat die auf eine Stimulation mit TNF α

hin zu erwartende Degradation von I κ B α [76] mit der Folge einer reduzierten nukleären Translokation von NF- κ B.

Die in dieser Arbeit gezeigte Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen durch eine gleichzeitige Inkubation mit TNF α und Butyrat könnte durch eine Butyrat vermittelte Inhibition der NF- κ B-Aktivierung zustande kommen. Eine Blockade des antiapoptotischen Weges erhöht die Rate apoptotischer Zellen [26, 39, 75, 122, 124].

In der kolorektalen Zelllinie HT-29 konnten Kovarikova et al. zeigen [125], daß eine Koinkubation von Butyrat (5mM) und TNF α (15ng/ml bzw. 30ng/ml) in einen erhöhten Anteil flottierender Zellen und einen erhöhten Anteil subdiploider Zellen nach 48h und 72h resultiert. Interessanterweise zeigte sich bei Vaculova et al. an HT-29 für eine Behandlung mit TNF α alleine ein subdiploider Populationsanteil sowie Kondensation und Fragmentation des nukleären Chromatins erst nach frühestens 96h [126]. Unsere Ergebnisse zeigen an zwei verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien – HT-29 und SW620 – beim Apoptosenachweis mittels Annexin V bereits nach 24h sowohl für Butyrat als auch für TNF α eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen. Weiter ergibt die Kombinationsbehandlung nach 24h bzw. 36h Inkubationszeit eine statistisch signifikante Zunahme der Rate apoptotischer Zellen gegenüber den Einzelsubstanzen [122], an HT-29 zeigt sich nach 24h sogar ein synergistischer Effekt, die Rate apoptotischer Zellen unter Kombination übersteigt signifikant die Summe aus den Raten der Einzelsubstanzen.

Ob nun ein direkter Eingriff in den Signaltransduktionweg [75, 76] die alleinige Ursache für die erhöhte Rate apoptotischer Zellen darstellt, oder ob Änderungen im Bereich freier Sauerstoffradikale [26, 39, 109] die Ursache sind, bleibt noch zu klären. Giardina et al. vermuteten eine durch Butyrat induzierte Erhöhung der Bildung freier Sauerstoffradikale als Grund für die Sensibilisierung von HT-29 Zellen gegenüber einer TNF α induzierten Apoptose [26]. Allerdings beweisen die so gezeigten Daten diese Theorie nicht vollständig: Zwar sensibilisiert H₂O₂ möglicherweise die Zellen für eine TNF α induzierte Apoptose, der durch H₂O₂ vermittelte Effekt ist jedoch deutlich stärker als der von Butyrat. Außerdem unterdrückt NAC, Antioxidans und NF- κ B-Inhibitor, nur partiell die durch die Kombination von Butyrat und TNF α induzierte Apoptose. Im Gegenteil, höhere Konzentrationen von NAC erhöhen die durch TNF α induzierte Apoptose auch in Abwesenheit von Butyrat [26].

Die Art und Weise, wie NF- κ B Zellüberleben oder die Inhibition von NF- κ B proapoptotische Effekte vermittelt, ist nach wie vor Gegenstand wissenschaftlichen Interesses: NF- κ B induziert die Expression verschiedener antiapoptotischer Gene, incl. der Bcl-2 Superfamilienmitglieder Bfl-1 [127], A20 [128], cIAP1 und 2 [129, 130] und der TRAF-Familie [120] wie auch IEX-1L [131]. Die NF- κ B induzierte Expression von TRAF-1 und -2 genau wie die von IAP1 und 2 blockiert die Caspase-8-Aktivierung durch TNFR1 [120]. Eine Wirkung von Butyrat über diesen Weg konnte bisher nicht gezeigt werden. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit die Expression von TRAF-1 und 2, von c-IAP1 und 2 und von XIAP auf mRNA-Ebene untersucht. Interessanterweise konnte weder eine basale Expression noch eine Transkription nach Stimulation mit Butyrat, TNF α oder einer Kombination der Substanzen detektiert werden. Während eine TRAF-1-Expression nur für Milz, Hoden und Lunge beschrieben ist [132] und damit eine bestimmte Funktion in diesen Geweben nahe legt, ist auch der eigentlich ubiquitär exprimierte TRAF-2 in SW620 weder basal noch nach Stimulation nachzuweisen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Jobin et al. überein [133], der in der kolorektalen Karzinomzelllinie HT-29 nur minimale und in Caco-2 Zellen keine mRNA- und Proteinlevel nachgewiesen konnte. Es liegt die Vermutung nahe, daß TRAF-2 in Kolonkarzinomzellen unterschiedlich exprimiert ist. Ebenso sind in SW620 weder basal noch nach Stimulation mRNAs der Mitglieder der IAP-Familie zu detektieren.

Zusammenfassend ist eine Modulation der antiapoptotischen Gene TRAF-1 und -2, c-IAP1 und 2 und XIAP durch eine Kombination von Butyrat und TNF α als Grund für die Steigerung der Apoptoserate nicht nachweisbar. Auf Grund der klaren Assoziation der gesteigerten Apoptose mit der Inhibition der NF- κ B-Aktivierung lässt sich eine Beteiligung anderer NF- κ B-beeinflußter antiapoptotischer Gene nicht ausschließen. Die für Buytrat bereits beschriebene [134, 135] Erhöhung von TRPM2 kann die Steigerung der Apoptoserate durch Buytrat und TNF α kaum erklären, da keine Modulation von TRPM2 durch TNF α vorliegt.

Entscheidend ist jedoch die Tatsache, daß Butyrat als Produkt anaerober Fermentation von primär vom menschlichen Verdauungssystem nicht abbaubaren Kohlenwasserstoffen in der Lage ist, Signalwege und damit die Wirkung körpereigener Botenstoff wie TNF α zu modulieren. Ein ähnlicher Effekt konnte auch für Fas gezeigt

werden [110]. Butyrat scheint also mit der durch TRADD vermittelten Kaskade zu interagieren.

Butyrat ist also sowohl in der Lage, die Effekte chemopräventiver Substanzen wie Aspirin zu verstärken, als auch Aktionen des Immunsystems gegenüber der Kolonmukosa im Sinne einer reduzierten Karzinogenese zu beeinflussen. Es bedarf zwar noch weiterer Untersuchungen, um die molekularen Grundlagen der Butyratwirkung komplett zu begreifen, doch erscheint es bereits beim momentanen Stand der Forschung als ein möglicher Kandidat für adjuvante Therapieansätze, durch den evtl. die benötigte Dosis an Immuno- und Chemotherapeutika reduziert und eine Resistenz des Tumors gesenkt werden könnte.

5. Zusammenfassung

Epidemiologische Studien weisen auf einen protektiven Einfluß einer ballaststoffreichen Ernährung gegenüber der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms hin. Die kurzkettige Fettsäure Butyrat ist ein wichtiges Produkt bakterieller Fermentation von Ballaststoffen bzw. von unverdaubaren Kohlenhydraten im Kolon. Butyrat hat paradoxe Effekte auf Epithelzellen des Kolons: Hauptenergieträger und Wachstumsstimulator normaler Mukosa einerseits, Proliferationshemmer und Apoptoseinduktor kolorektaler Karzinomzellen in vitro andererseits.

Auch für NSAID wie Aspirin belegen epidemiologische Studien einen chemoprotektiven Effekt gegenüber dem Kolonkarzinom. Für das Zytokin TNF α werden einerseits apoptoseinduzierende Effekte für kolorektale Karzinomzellen in vitro beschrieben, jedoch gelten einige Kolonkarzinomzelllinien als resistent gegen TNF α . Andererseits besitzt TNF α auch proinflammatorische und antiapoptotische Wirkung über Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse sowohl von Aspirin als auch von TNF α auf die durch Butyrat induzierte Apoptose an humanen kolorektalen Karzinomzelllinien untersucht.

Zu diesem Zweck wurde ein durchflußzytometrischer Annexin V – Propidiumjodid – Assay etabliert. Mit Hilfe dieses Assays konnte gezeigt werden, daß der Apoptose induzierende Effekt sich sowohl durch eine Kombination mit Aspirin als auch durch eine Kombination mit TNF α im Sinne einer additiven Wirkung steigern läßt. Der Einfluß von Butyrat auf die antiapoptotische Wirkung von TNF α über Modulation von NF- κ B wurde in einem Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) untersucht. Die Verstärkung der Butyrat-induzierten Apoptose durch eine Kombination mit TNF α ist mit einer Hemmung der TNF α induzierten Aktivierung von NF- κ B assoziiert. In einem RNase Protection Assay war auf mRNA-Ebene keine Beeinflussung der NF- κ B abhängigen antiapoptotischer Faktoren (TRAF-1 und -2, c-IAP1 und 2 und XIAP) durch Butyrat nachweisbar.

Die Verstärkung der Apoptose durch TNF α zeigt, daß Butyrat in seiner protektiven Wirkung in der Lage ist, neben einer direkten Beeinflussung der Kolonozyten auch auf körpereigene Signalwege zu wirken. Die Untersuchungen dieser Arbeit leisten einen Beitrag zur weiteren Klärung der molekularen Grundlagen der Butyratwirkung auf Kolonepithelzellen. Evtl. besteht in Zukunft die Möglichkeit, Butyrat als adjuvantes Therapeutikum bei Prävention und Therapie kolorektaler Karzinome zu verwenden.

6. Literaturverzeichnis

1. Parkin, D.M., et al., *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. Int J Cancer, 2001. **94**(2): p. 153-6.
2. Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay, *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 1999. **49**(1): p. 33-64, 1.
3. Ferlay, J., et al., *IARC CancerBase No. 4. Lyon, IARC Press, 1999*: URL: <http://www.pharma.unibas.ch/fgpharm/download/Karzinome.pdf>.
4. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-70.
5. Sandler, R.S., *Epidemiology and risk factors for colorectal cancer*. Gastroenterol Clin North Am, 1996. **25**(4): p. 717-35.
6. Solomon, M.J. and M. Schnitzler, *Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment*. World J Surg, 1998. **22**(4): p. 352-8.
7. Tahara, H., et al., *Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections*. Oncogene, 1999. **18**(8): p. 1561-7.
8. Howe, G.R., et al., *Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies [see comments]*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**([Qiao, 1998 #13]): p. 1887-96.
9. McIntyre, A., P.R. Gibson, and G.P. Young, *Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model*. Gut, 1993. **34**(3): p. 386-91.
10. Cummings, J.H., *Short chain fatty acids in the human colon*. Gut, 1981. **22**(9): p. 763-79.
11. Roediger, W.E., *Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon*. Gastroenterology, 1982. **83**(2): p. 424-9.
12. Roediger, W.E., *Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man*. Gut, 1980. **21**(9): p. 793-8.

13. Roediger, W.E. and S. Nance, *Selective reduction of fatty acid oxidation in colonocytes: correlation with ulcerative colitis*. *Lipids*, 1990. **25**(10): p. 646-52.
14. Hass, R., et al., *Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig [comment]*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(3): p. 875-81.
15. Scheppach, W., et al., *Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1992. **16**(1): p. 43-8.
16. Velazquez, O.C., H.M. Lederer, and J.L. Rombeau, *Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia*. *Dig Dis Sci*, 1996. **41**(4): p. 727-39.
17. Velazquez, O.C., et al., *In vivo crypt surface hyperproliferation is decreased by butyrate and increased by deoxycholate in normal rat colon: associated in vivo effects on c-Fos and c-Jun expression*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1996. **20**(4): p. 243-50.
18. Hague, A. and C. Paraskeva, *The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines*. *Eur J Cancer Prev*, 1995. **4**(5): p. 359-64.
19. Gamet, L., et al., *Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29*. *Int J Cancer*, 1992. **52**(2): p. 286-9.
20. Basson, M.D., et al., *Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate*. *Dig Dis Sci*, 1996. **41**(10): p. 1989-93.
21. Basson, M.D., N.J. Emenaker, and F. Hong, *Differential modulation of human (Caco-2) colon cancer cell line phenotype by short chain fatty acids*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998. **217**(4): p. 476-83.
22. Chai, F., et al., *Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(1): p. 7-14.
23. Compher, C.W., et al., *Wheat bran decreases aberrant crypt foci, preserves normal proliferation, and increases intraluminal butyrate levels in experimental colon cancer*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1999. **23**(5): p. 269-77; discussion 277-8.
24. Crew, T.E., D.J. Elder, and C. Paraskeva, *A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of*

- butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate*. Carcinogenesis, 2000. **21**(1): p. 69-77.
25. Csordas, A., *Butyrate, aspirin and colorectal cancer [see comments]*. Eur J Cancer Prev, 1996. **5**(4): p. 221-31.
 26. Giardina, C., H. Boulares, and M.S. Inan, *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): p. 425-38.
 27. Fan, Y.Y., et al., *Antagonism of CD95 signaling blocks butyrate induction of apoptosis in young adult mouse colonic cells*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 1): p. C310-9.
 28. Heerdt, B.G., M.A. Houston, and L.H. Augenlicht, *Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines*. Cancer Res, 1994. **54**(12): p. 3288-93.
 29. Janson, W., G. Brandner, and J. Siegel, *Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53- independent differentiation and apoptosis*. Oncogene, 1997. **15**(12): p. 1395-406.
 30. Litvak, D.A., et al., *Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1*. Surgery, 1998. **124**(2): p. 161-9; discussion 169-70.
 31. Lupton, J.R., *Butyrate and colonic cytokinetics: differences between in vitro and in vivo studies*. Eur J Cancer Prev, 1995. **4**(5): p. 373-8.
 32. McIntyre, A., et al., *Different fibers have different regional effects on luminal contents of rat colon*. Gastroenterology, 1991. **101**(5): p. 1274-81.
 33. Weaver, G.A., et al., *Short chain fatty acid distributions of enema samples from a sigmoidoscopy population: an association of high acetate and low butyrate ratios with adenomatous polyps and colon cancer*. Gut, 1988. **29**(11): p. 1539-43.
 34. Gibson, P.R., et al., *Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate*. Carcinogenesis, 1999. **20**(4): p. 539-44.
 35. Archer, S.Y. and R.A. Hodin, *Histone acetylation and cancer*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(2): p. 171-4.

36. Bernhard, D., et al., *Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts*. *Faseb J*, 1999. **13**(14): p. 1991-2001.
37. Saito, A., et al., *A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(8): p. 4592-7.
38. Witt, O., K. Sand, and A. Pekrun, *Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways*. *Blood*, 2000. **95**(7): p. 2391-2396.
39. Inan, M.S., et al., *The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line [see comments]*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(4): p. 724-34.
40. Souleimani, A. and C. Asselin, *Regulation of C-fos expression by sodium butyrate in the human colon carcinoma cell line Caco-2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **193**(1): p. 330-6.
41. Thompson, M.A., et al., *c-Myb down-regulation is associated with human colon cell differentiation, apoptosis, and decreased Bcl-2 expression*. *Cancer Res*, 1998. **58**(22): p. 5168-75.
42. Greenberg, E.R. and J.A. Baron, *Aspirin and other nonsteroid anti-inflammatory drugs as cancer- preventive agents*. *IARC Sci Publ*, 1996(139): p. 91-8.
43. Thun, M., M. Namboodiri, and C. Heath, *Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer*. *New Engl J Med*, 1991. **325**(23): p. 1593-1596.
44. Thun, M.J., et al., *Aspirin use and risk of fatal cancer [see comments]*. *Cancer Res*, 1993. **53**(6): p. 1322-7.
45. Giovannucci, E., et al., *Aspirin and the risk of colorectal cancer in women [see comments]*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(10): p. 609-14.
46. Giovannucci, E., et al., *Aspirin use and the risk for colorectal cancer in male health professionals*. *Ann Int Med*, 1994. **121**(4): p. 241-246.
47. Muir, K.R. and R.F.A. Logan, *Aspirin, NSAIDs and colorectal cancer - what do the epidemiological studies show and what do they tell us about the modus operandi?* *Apoptosis*, 1999. **4**: p. 389-396.

48. Aoki, T., C. Boland, and D. Brenner, *Aspirin modulation of premalignant biomarkers in rectal mucosa of high-risk subjects*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(4): p. A484.
49. Jackson, L. and C. Hawkey, *NSAIDs and the GI tract-potential hazards and benefits*. *Apoptosis*, 1999. **4**: p. 397-402.
50. Giardiello, F., et al., *Prostaglandin levels in human colorectal mucosa. Effects of sulindac in patients with familial adenomatous polyps*. *Dig Dis Sci*, 1998. **43**(2): p. 311-6.
51. Bedi, A., et al., *Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer*. *Cancer Res*, 1995. **55**: p. 1811-16.
52. Jacoby, R.F., et al., *Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc Min mouse model by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam*. *Cancer Res*, 1996. **56**(4): p. 710-4.
53. Barnes, C.J. and M. Lee, *Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin*. *Gastroenterology*, 1998. **114**(5): p. 873-7.
54. Craven, P. and F. DeRubertis, *Effects of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 1992. **13**(4): p. 541-6.
55. Reddy, B.S., et al., *Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats*. *Carcinogenesis*, 1993. **14**(8): p. 1493-7.
56. Shiff, S.J., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis*. *Exp Cell Res*, 1996. **222**(1): p. 179-88.
57. Subbegowda, R. and T.O. Frommel, *Aspirin toxicity for human colonic tumor cells results from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest*. *Cancer Res*, 1998. **58**(13): p. 2772-6.
58. Qiao, L., et al., *Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells*. *Biochem Pharmacol*, 1998. **55**(1): p. 53-64.
59. Hanif, R., et al., *Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway*. *Biochem Pharmacol*, 1996. **52**(2): p. 237-45.

60. Castano, E., et al., *Aspirin induces cell death and caspase-dependent phosphatidylserine externalization in HT-29 human colon adenocarcinoma cells*. Br J Cancer, 1999. **81**(2): p. 294-9.
61. Marnett, L.J., *Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer*. Cancer Res, 1992. **52**(20): p. 5575-89.
62. Pugh, S. and G. Thomas, *Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2*. Gut, 1994. **35**: p. 675-8.
63. Dimberg, J., et al., *Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer [see comments]*. Gut, 1999. **45**(5): p. 730-2.
64. Rigas, B. and S.J. Shiff, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the induction of apoptosis in colon cells; Evidence for PHS-dependent and PHS-independent mechanisms*. 1999, 1999. **4**: p. 373-381.
65. Shiff, S.J. and B. Rigas, *The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) [comment]*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 445-50.
66. Zhang, X., et al., *Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts [see comments]*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 451-59.
67. Elder, D.J.E. and C. Paraskeva, *Induced apoptosis in the prevention of colorectal cancer by non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Apoptosis, 1999. **4**: p. 365-372.
68. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death [see comments]*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
69. Hsu, H., et al., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 1996. **84**(2): p. 299-308.
70. Abreu-Martin, M.T., et al., *Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen*. J Immunol, 1995. **155**(9): p. 4147-54.

71. Srinivasula, S.M., et al., *CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF-kappaB activation and apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17946-54.
72. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 4961-5.
73. Coleman, T.A., et al., *Acquisition of NFKB1-selective DNA binding by substitution of four amino acid residues from NFKB1 into RelA*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 3850-9.
74. Kunsch, C. and C.A. Rosen, *NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6137-46.
75. Luhrs, H., et al., *Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(4): p. 458-66.
76. Luhrs, H., et al., *Cytokine-activated degradation of inhibitory kappaB protein alpha is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate*. Int J Colorectal Dis, 2001. **16**(4): p. 195-201.
77. Schottelius, A.J. and A.S. Baldwin, Jr., *A role for transcription factor NF-kappa B in intestinal inflammation*. Int J Colorectal Dis, 1999. **14**(1): p. 18-28.
78. Li, Z.W., et al., *The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1839-45.
79. Karin, M., *The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27339-42.
80. Haas, E., et al., *Continuous autotropic signaling by membrane-expressed tumor necrosis factor*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 18107-12.
81. Bergmann, M., et al., *IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha-induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6607-10.

82. Schwenger, P., et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I κ B α phosphorylation and degradation.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 78-84.
83. Modur, V., et al., *Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades.* J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13094-102.
84. Hanafusa, H., et al., *Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression.* J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 27161-7.
85. McDade, T.P., et al., *Salicylates inhibit NF-kappaB activation and enhance TNF-alpha-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells.* J Surg Res, 1999. **83**(1): p. 56-61.
86. Aubry, J.P., et al., *Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity.* Cytometry, 1999. **37**(3): p. 197-204.
87. Clarke, R.G., et al., *Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-G0 DNA content.* Cytometry, 2000. **39**(2): p. 141-50.
88. Lassar, A.B., et al., *MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer.* Cell, 1989. **58**(5): p. 823-31.
89. Briegel, K., et al., *One base pair change abolishes the T cell-restricted activity of a kB-like proto-enhancer element from the interleukin 2 promoter.* Nucleic Acids Res, 1991. **19**(21): p. 5929-36.
90. Han, S.Y., et al., *Activation of NF-kappaB determines the sensitivity of human colon cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis.* Biol Pharm Bull, 2000. **23**(4): p. 420-6.
91. Hague, A., et al., *Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer.* Int J Cancer, 1993. **55**(3): p. 498-505.
92. Heerdt, B.G., et al., *Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-*

- chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity.* Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1584-91.
93. Heerdt, B.G., et al., *Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_{mt}$) in the coordination of p53-independent proliferation and apoptosis pathways in human colonic carcinoma cells.* Cancer Res, 1998. **58**(13): p. 2869-75.
 94. Ruemmele, F.M., et al., *Butyrate mediates caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) [In Process Citation].* Cell Death Differ, 1999. **6**(8): p. 729-35.
 95. Medina, V., et al., *Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway.* Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3697-707.
 96. Kirlin, W.G., et al., *Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells.* J Nutr, 1999. **129**(10): p. 1827-35.
 97. Menzel, T., et al., *Butyrate and aspirin in combination have an enhanced effect on apoptosis in human colorectal cancer cells.* Eur J Cancer Prev, 2002. **11**(3): p. 271-81.
 98. Caderni, G., et al., *Slow-release pellets of sodium butyrate increase apoptosis in the colon of rats treated with azoxymethane, without affecting aberrant crypt foci and colonic proliferation.* Nutr Cancer, 1998. **30**(3): p. 175-81.
 99. D'Argenio, G., et al., *Butyrate enemas in experimental colitis and protection against large bowel cancer in a rat model.* Gastroenterology, 1996. **110**(6): p. 1727-34.
 100. Fuchs, C.S., et al., *Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women [see comments].* N Engl J Med, 1999. **340**(3): p. 169-76.
 101. Clausen, M.R., H. Bonnen, and P.B. Mortensen, *Colonic fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer.* Gut, 1991. **32**(8): p. 923-8.

102. Bellosillo, B., et al., *Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells [see comments]*. *Blood*, 1998. **92**(4): p. 1406-14.
103. Elder, D.J. and C. Paraskeva, *COX-2 inhibitors for colorectal cancer [news]*. *Nat Med*, 1998. **4**(4): p. 392-3.
104. Kamitani, H., M. Geller, and T. Eling, *Expression of 15-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(34): p. 21569-77.
105. Wachtershauser, A., et al., *Expression of 5-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during butyrate-induced cell differentiation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **268**(3): p. 778-83.
106. Barnard, J.A. and G. Warwick, *Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells*. *Cell Growth Differ*, 1993. **4**(6): p. 495-501.
107. Heerdt, B.G., M.A. Houston, and L.H. Augenlicht, *Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function*. *Cell Growth Differ*, 1997. **8**(5): p. 523-32.
108. McBain, J.A., et al., *Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **53**(9): p. 1357-68.
109. Giardina, C. and M.S. Inan, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1401**(3): p. 277-88.
110. Bonnotte, B., et al., *Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate*. *Cell Death Differ*, 1998. **5**(6): p. 480-7.
111. Chapkin, R.S., Y. Fan, and J.R. Lupton, *Effect of diet on colonic-programmed cell death: molecular mechanism of action*. *Toxicol Lett*, 2000. **112-113**(8): p. 411-414.
112. Hassig, C.A., J.K. Tong, and S.L. Schreiber, *Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer*. *Chem Biol*, 1997. **4**(11): p. 783-9.
113. Sugiyama, H., et al., *Selective sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by blockade of NF-kappaB in primary glomerular mesangial cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(28): p. 19532-7.

114. Shao, R., et al., *EIA sensitizes cells to tumor necrosis factor-induced apoptosis through inhibition of IkappaB kinases and nuclear factor kappaB activities*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21495-8.
115. Mortellaro, A., et al., *New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa B and AP-1 activation*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7102-9.
116. Kolenko, V., et al., *Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 590-8.
117. Kaltschmidt, B., et al., *Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9409-14.
118. Diaz-Meco, M.T., et al., *Inactivation of the inhibitory kappaB protein kinase/nuclear factor kappaB pathway by Par-4 expression potentiates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(28): p. 19606-12.
119. Mayo, M.W., et al., *Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras*. Science, 1997. **278**(5344): p. 1812-5.
120. Wang, C.Y., et al., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.
121. Wang, C.Y., M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr., *TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB [see comments]*. Science, 1996. **274**(5288): p. 784-7.
122. Luhrs, H., et al., *Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB*. Anticancer Res, 2002. **22**(3): p. 1561-8.
123. Giuliano, M., et al., *The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cells*. Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5586-95.
124. Andoh, A., et al., *Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced complement C3 and factor B*

- biosynthesis in human intestinal epithelial cells*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(1): p. 23-9.
125. Kovarikova, M., et al., *TNF-alpha modulates the differentiation induced by butyrate in the HT-29 human colon adenocarcinoma cell line*. Eur J Cancer, 2000. **36**(14): p. 1844-52.
 126. Vaculova, A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis associated with poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in HT-29 colon cancer cells*. Anticancer Res, 2002. **22**(3): p. 1635-9.
 127. Lee, H.H., et al., *NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9136-41.
 128. Krikos, A., C.D. Laherty, and V.M. Dixit, *Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 17971-6.
 129. Chu, Z.L., et al., *Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10057-62.
 130. Stehlik, C., et al., *Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 211-6.
 131. Wu, M.X., et al., *IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival*. Science, 1998. **281**(5379): p. 998-1001.
 132. Jacobsen, F.W., et al., *Role of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10695-9.
 133. Jobin, C., et al., *TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4447-54.
 134. Koch-Brandt, C. and C. Morgans, *Clusterin: a role in cell survival in the face of apoptosis?* Prog Mol Subcell Biol, 1996. **16**: p. 130-49.

135. Basson, M.D., et al., Identification and comparative analysis of human colonocyte short-chain fatty acid response genes. *J Gastrointest Surg*, 2000. 4(5): p. 501-12.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach für die Möglichkeit danken, dieses Thema bearbeiten und die Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. W. Timmermann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Dem Direktor des Pathologischen Instituts, Herrn Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink, danke ich für die Erlaubnis, in seinem Institut die durchflußzytometrischen Messungen durchführen zu dürfen.

Für die geduldige Betreuung und Anregungen im praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit danke ich meinen Betreuern, Drs. med. Hardi Lührs und Thomas Menzel.

Dem Team des Gastrolabors – Gerda Dusel, Elisabeth Kelber, Kerstin Backhaus und Donata Kuhn - gilt mein besonderer Dank für technische und moralische Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Ebenso danke ich Christa Amrehn und Andrea Homburger vom pathologischen Institut für die Beantwortung vieler Fragen bei der Etablierung der Durchflußzytometrie.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Theodor Robert Helmut Kudlich
Geburtsdatum	31.12.1974
Geburtsort	Bayreuth
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

Schulausbildung

IX/1981 - VII/1985:	Besuch der Volksschule Kemnath
IX/1985 - VII/1994:	Besuch des Gymnasiums Christian Ernestinum in Bayreuth Abschluß mit Abitur, Note 1,6

Bundeswehr

III/1996 - XII/1996	Ableistung des Wehrdienstes im Sanitätsbereich der Luftwaffe
---------------------	--------------------------------------------------------------

Studium

WS 1994/95:	Studium der Physik an der Universität Bayreuth
SS 1995 – WS 1995/96:	Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
SS 1996:	Unterbrechung des Studiums zur Ableistung des Wehrdienstes
WS 1996/97 – WS 2000/01:	Fortsetzung des Studiums der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
April 2001 – März 2002:	Praktisches Jahr an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Pathologie

Physikum:	September 1997, Note 2,66
1. Staatsexamen:	August 1998, Note 3,0
2. Staatsexamen:	März 2001, Note 2,0
3. Staatsexamen:	23. Mai 2002, Note 2,0

Würzburg, 12. Mai 2003

Theodor Kudlich