

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Mechanismen der Modulation der Kolonkarzinogenese durch definierte Nahrungsbestandteile wie
Lycopin und β -Carotin**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Friedmar Weber

aus Neumarkt i. d. Oberpfalz

Würzburg, Dezember 2012

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Scheppach

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Geier

Dekan: Prof. Dr. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

21.12.2012

Der Promovend ist Arzt

Für Martina

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1 Das kolorektale Karzinom	1
1.2 Zellzyklus, Proliferatiion und Apoptose.....	3
1.3 Carotinoide	7
1.4 Ballaststoffe und Butyrat	12
1.5 Histondeacetylase und Trichostatin A.....	14
1.6 Nukleäre Hormonrezeptoren	15
1.6.1 RXR α	16
1.6.2 PPAR γ	16
1.7 Fragestellung der Arbeit.....	18
2. Material & Methoden	
2.1 Zellkultur	20
2.1.1 Zelllinien und Kulturmedien	20
2.1.2 Zellkulturversuche	20
2.2 Western Blot	22
2.2.1 SDS-PAGE, Blotting und Färbung	22
2.2.2 Antikörper	24
2.3 Statistische Analyse	24
3. Ergebnisse	
3.1 Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen unter Inkubation mit Carotinoiden	25
3.1.1 Lycopin	25
3.1.2 β -Carotin	25
3.2 Beeinflussung der Expression von an der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteinen durch Carotinoide	27
3.2.1 cdk2	27
3.2.2 p21	28
3.2.3 p27	28
3.2.4 p53	29
3.2.5 PCNA	30
3.3 Beeinflussung der Expression des nukleären Hormonrezeptors PPAR γ durch Carotinoide	31
3.4 Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen unter Inkubation mit Butyrat und Trichostatin A	33
3.5 Beeinflussung der Expression nukleärer Hormonrezeptoren durch Butyrat	36
3.5.1 PPAR γ	36
3.5.2 RXR α	37
3.6 Beeinflussung der Expression nukleärer Hormonrezeptoren durch Trichostatin A	38
3.6.1 PPAR γ	38
3.6.2 RXR α	39
4. Diskussion	
4.1 Carotinoide	42
4.2 Butyrat	47
5. Zusammenfassung und Ausblick	56
6. Literaturverzeichnis	59
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist einer der häufigsten Tumore in den westlichen Ländern. In Deutschland erkranken knapp über 70.000 Menschen jährlich an einem kolorektalen Karzinom. Es ist sowohl bei Männern (nach dem Bronchialkarzinom) als auch bei Frauen (nach dem Mammakarzinom) das zweithäufigste Karzinom. Die Inzidenz verdoppelt sich bei über 40-Jährigen in etwa alle zehn Jahre. Der Manifestationsgipfel liegt in der 6. und 7. Lebensdekade. Das Lebenszeitrisiko zur Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms liegt in Deutschland in der Allgemeinbevölkerung bei etwa 6% (Tumorzentrum München 2006). Der Großteil der kolorektalen Karzinome entsteht sporadisch, nur etwa 5% sind hereditäre Formen (FAP: *Familial Adenomatous Polyposis*, etwa 1%, HNPCC: *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*, 3-5%) oder entstehen als Folge chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

Durch eine Früherkennung mittels rektaler Untersuchung, Testung auf okkultes Blut im Stuhl und Koloskopie (Sekundärprävention) lassen sich Inzidenz und Mortalität der Erkrankung senken. Die stadienabhängige Therapie besteht in Operation und (neo-) adjuvanter / palliativer Chemotherapie. Durch eine Erweiterung des klassischen Spektrums der eingesetzten Chemotherapeutika (5-Fluoruracil, Cisplatin) um Substanzen wie Irinotecan, Oxaliplatin oder das oral anwendbare 5-FU-Prodrug Capecitabin konnten in den letzten Jahren die onkologischen Therapiemöglichkeiten deutlich verbessert werden. Neuerdings findet auch eine zielgerichtete Blockade von bei vielen Tumorentitäten überexprimierten EGF- bzw. VEGF-Signalwegen durch monoklonale Antikörper klinische Anwendung beim metastasierten kolorektalen Karzinom (EGF-Rezeptor-Antikörper Cetuximab, VEGF-Antikörper Bevacizumab). Zudem hat sich die Effektivität einer neoadjuvanten Radiochemotherapie beim Rektumkarzinom gezeigt.

Die 5-Jahres-Überlebensrate des kolorektalen Karzinoms liegt bei etwa 50%.

Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms wird als das Ergebnis eines Wechselspiels von genetischen und Umwelteinflüssen verstanden, die zu Mutationen bzw. zur Aktivierung verschiedener Gene führen können. Die Aktivierung von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt nach dem Modell der Tumorprogression von Vogelstein von normalem Gewebe über das Adenom zum Karzinom (Fearon 1990, Kinzler 1992). Protoonkogene wie Tumorsuppressorgene tragen zur Kontrolle des Zellzyklus und zur Regulation des Gleichgewichts zwischen Zellteilung und Zelltod bei, ein Ungleichgewicht kann zu überschießender, unkontrollierter Proliferation und damit Tumorentstehung führen. Protoonkogene wie *k-ras* oder *c-myc* liegen in allen Zellen als inaktive Vorstufen der Onkogene vor, die an der Regulation der Zellproliferation und Signaltransduktion beteiligt sind. So aktiviert die Mutation des Protoonkogens *k-ras* das Onkogen, dies induziert eine dauerhafte Stimulation von Wachstumssignalen, was zur unkontrollierten Proliferation beiträgt. Zu den Tumorsuppressorgenen zählen *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *p53* (siehe weiter unten) und *DCC* (*deleted in colon carcinoma*). Die Inaktivierung von *APC* ist ein frühes Ereignis in der Kolonkarzinogenese, es kommt über verminderte Bindung von β -Catenin zur Hyperproliferation der Zellen. Bei der erblichen FAP liegt eine Schädigung des *APC*-Gens vor. *DCC* ist an der Apoptose beteiligt und führt in Tumorzellen zu einem Zellzyklusarrest am Übergang in die M-Phase. In 70% aller Kolonkarzinome liegt es in mutierter Form vor, was sich in unkontrollierter Proliferation äußert (Fearon 1990).

Des Weiteren spielen Mutationen in Genen, deren Genprodukte an der DNA-Reparatur beteiligt sind, eine Rolle in der Karzinogenese. In etwa 90% der Fälle von HNPCC lässt sich eine sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (MSI) nachweisen. Hierbei findet sich eine unterschiedliche Länge kurzer repetitiver Gensequenzen wie beispielsweise Poly-A- oder GT-Wiederholungen. Ursächlich hierfür sind Mutationen in Genen, die an der Reparatur von Fehlern der korrekten DNA-Prozessierung beteiligt sind wie *MSH2*. Im Gegensatz zu Mikrosatelliten-stabilen (MSS) zeigen MSI-Kolonkarzinomzellen nur wenige strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen (Melcher 2002).

Als wichtigste Umweltfaktoren, die die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms beeinflussen, werden Ernährung und Lebensgewohnheiten angenommen (Kim 2000). So liegt auch die Inzidenz in Entwicklungsländern deutlich niedriger als in Industriestaaten. Der Verzehr kalorienreicher Nahrung, gesättigter Fettsäuren und Alkohol korreliert nach epidemiologischen Studien positiv mit der Inzidenz kolorektaler Tumore, wohingegen eine obst-, gemüse- und ballaststoffreiche Ernährung das Risiko solcher Tumore zu senken scheint (Potter 1993, Sandler 1996). In einer großen prospektiven Studie mit über 100.000 Probanden reduzierte eine ballaststoffreiche Ernährung das Risiko für das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms um etwa 40% (Bingham 2003). Die genauen Beziehungen einzelner Nahrungsbestandteile zur Tumorgenese sind jedoch unklar.

Daneben gibt es auch Daten, die der langjährigen Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) wie Acetylsalicylsäure (ASS) tumorprotektive Effekte zuschreiben (Muir 1999). Eine gezielte Senkung von Mortalität und Inzidenz durch eine Primärprävention im Sinne einer gesunden Ernährung und durch Chemoprävention scheint also möglich zu sein.

Diese Dissertation richtet das Augenmerk auf zwei Gruppen von Nahrungsbestandteilen, denen tumorprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden: Carotinoide und Ballaststoffe.

1.2 Zellzyklus, Proliferation und Apoptose

Der Zeitraum zwischen zwei Zellteilungen wird als Zellzyklus bezeichnet. Er besteht aus der kurzen M-Phase (Mitose) und der langen Interphase, welche sich wiederum aufteilt in G₁- (*gap*), S- (Synthese der DNA) und G₂-Phase. Die G₁-Phase dient unter anderem der Reparatur von Fehlern in der DNA, bevor diese in der S-Phase repliziert wird. In der M-Phase werden dann die beiden entstandenen Chromosomensätze gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Findet keine Zellteilung statt, so geht die Zelle in die G₀-Phase (Ruhe-Phase) über.

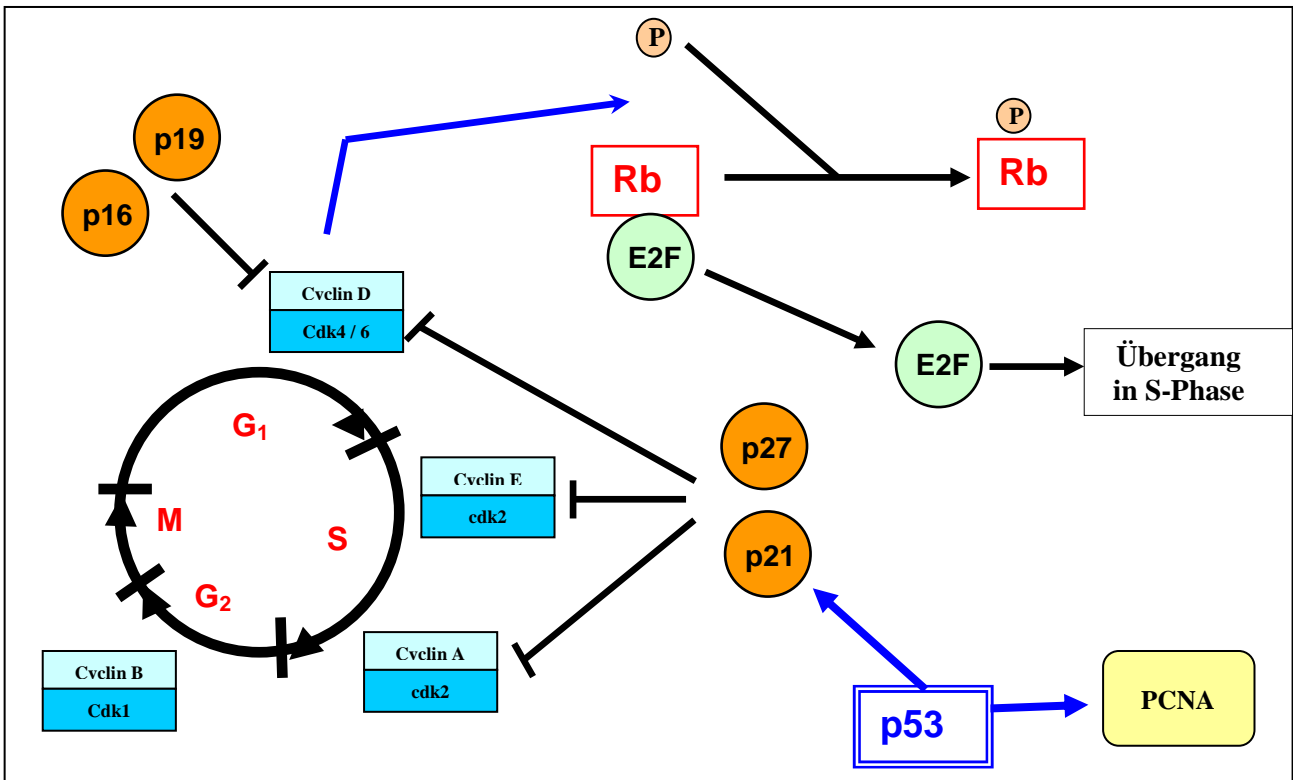
Die Übergänge von einer Phase in die nächste werden von verschiedenen Proteinen kontrolliert. Dazu gehören unter anderen die Cyclin-abhängigen

Kinasen (*cyclin dependent kinases*, cdk), deren Aktivierung die Bindung an regulatorische Proteine, die Cycline erfordert. Das Voranschreiten der Zelle durch den Zellzyklus wird insbesondere an zwei Stellen kontrolliert (Übergänge G₁/S und G₂/M). Der Übergang G₁/S wird als Restriktionspunkt bezeichnet. Hier führen Komplexe aus cdk4/6 und Cyclin D zur Phosphorylierung des Retinoblastoma-Tumorsuppressorgens (Rb), wodurch der Transkriptionsfaktor E2F aktiviert wird. Dies ist entscheidend für die Passage des Restriktionspunktes; die S-Phase kann beginnen. Diese wird wiederum durch cdk2 und die Cycline A und E kontrolliert. Für den G₂/M-Übergang ist schließlich die Aktivierung von cdk1 durch Cyclin B erforderlich. (Morgan 1995, 1997)

Andere Proteine, sogenannte cdk-Inhibitoren, vermögen nun wiederum durch Blockade von cdk-Cyclin-Komplexen den Zellzyklus zum Erliegen zu bringen. p21^{waf1/cip1} und p27^{kip1} sind universale cdk-Inhibitoren, während p16, p18 und p19 selektiv cdk4 und cdk6 inhibieren (Sherr 1999). p21 inhibiert den cdk2-Cyclin A/E- sowie den cdk4/6-Cyclin D-Komplex, die Zelle verbleibt in der G₁-Phase, es erfolgt keine DNA-Synthese; die Zelle hat somit in der G₁-Phase mehr Zeit, mögliche DNA-Schäden vor einer weiteren Replikation auszubessern (Harper 1995). Stellt die Zelle Schäden an der DNA fest, so reagiert das Tumorsuppressorgen p53 mit einer Aktivierung von p21 und anderen Genen, was durch einen Zellzyklusarrest den DNA-Reperatur-Prozess ermöglicht (el-Deiry 1994, Agarwal 1998). In 50-70% der Kolonkarzinome liegt p53 in mutierter Form vor, welches nicht in der Lage ist, auf diese Weise Reparaturmechanismen zu induzieren (Michalovitz 1990, Chung 2000).

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*, ein Bestandteil der DNA-Polymerase δ) ist ein weiterer an der DNA-Synthese beteiligter Faktor, der an der durch p21 induzierten Zellzyklus-Inhibition mitwirkt (Cayrol 1998). (s. Schema 1)

Ein Versagen von DNA-Reparatur-Prozessen und andere Abweichungen in der normalen Zellzykluskontrolle können zu unkontrollierter Zellproliferation führen und gehören zu den häufigsten Veränderungen in Tumorzellen.



Schema 1: Zellzykluskontrolle.

Proliferationshemmung kann einerseits Folge einer Hemmung des Wachstums durch Blockade des Zellzyklus, andererseits Folge einer Steigerung der Apoptose, des sogenannten „programmierten Zelltodes“, sein, der der Eliminierung geschädigter und mutierter Zellen dient (Kerr 1972, Ellis 1991). Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der der gezielten, aktiven Eliminierung einzelner Zellen dient. Sie kann über verschiedenen Signalketten induziert werden, die in der Aktivierung oder Neusynthese bestimmter Proteine und dadurch beispielsweise Veränderungen der Zellmembran oder der Degradation der DNA resultieren und schließlich zur Zerstörung der zellulären Integrität führen.

Stark vereinfacht dargestellt wird Apoptose auf molekularer Ebene durch die aufeinanderfolgende kaskadenartige Aktivierung verschiedener, Caspasen genannter Proteine bewirkt. Zum einen kann dies extrinsisch durch Aktivierung sogenannter *death domains* induziert werden. Moleküle wie der Fas-Ligand

aktivieren durch Bindung an seinen Rezeptor Apo-1 die FADD (*Fas associated death domain*). Der Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) dagegen bindet an seinen Rezeptor TNF-R1, was letztlich über Bindung an eine *death domain* wieder zur Aktivierung des Caspasen-Signalwegs und damit der Apoptose führt. Zum anderen können mitochondriale Faktoren durch Interaktion mit Caspasen hemmend oder fördernd auf die Apoptose einwirken. Es gibt dabei pro-apoptotische (z.B. bax, bcl-x_s, bad) und anti-apoptotische (z.B. bcl-2, bcl-x_l) Faktoren.

$\text{TNF}\alpha$ kann daneben über einen speziellen Rezeptor die I κ B-Kinase (IKK) aktivieren, welche I κ B α (*inhibitory protein κ B α*) phosphoryliert, das konsekutiv ubiquiniert und degradiert wird und so den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor κ B*) aus seiner Bindung entlässt. NF- κ B transloziert in den Zellkern und induziert die Transkription anti-apoptotischer Faktoren (Review in Granville 1998, Beg 1996).

Daneben kann $\text{TNF}\alpha$ den Transkriptionsfaktor AP-1 induzieren, was zu vermehrter Proliferation von Karzinomzellen führt (Karin 1997, Glinghammar 1999). AP-1 interagiert ebenfalls mit NF- κ B und führt bei gemeinsamer Bindung an die DNA zu synergistischen Effekten auf die Transkriptionsraten der Zielgene von AP-1 und NF- κ B (sog. *cross coupling*) (Stein 1993, Scheinman 1995).

Ein komplexes System entscheidet so darüber, ob es zur Zellteilung kommt, ob die Zelle in Ruhe bleibt oder in Apoptose geht. Charakteristisch für das Wachstum maligner Zellen sind Fehler in den Genen, die für solche Zellzyklus regulierenden Proteine kodieren, wodurch es zu unkontrollierter Zellproliferation kommen kann. So werden cdk1, cdk2 und cdk4 sowie die Cycline D1 und E in Kolonneoplasien häufig verstärkt exprimiert (Arber 1996, Zhang 1997, Weinstein 2000). Dagegen ist eine niedrigere Expression von cdk-Inhibitoren (p21, p27) mit einer Prognoseverschlechterung von Kolonkarzinomen verbunden (Sgambato 2000).

1.3 Carotinoide

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien konnte zeigen, dass der Verzehr einer obst- und gemüsereichen Ernährung positiv mit einer verringerten Häufigkeit von Tumorerkrankungen korreliert (Colditz 1985, Bertram 1987, Ziegler 1991, Block 1992, Gerster 1993). Besondere Aufmerksamkeit wurde in diesem Zusammenhang der großen Gruppe der Carotinoide zuteil. Carotinoide sind natürliche Kohlenwasserstoffe ($C_{40}H_{56}$) mit langkettiger Polyisoprenoid-Struktur, einer Reihe konjugierter Doppelbindungen und lipophilen Eigenschaften, die zu den sogenannten sekundären Pflanzenstoffen gerechnet werden (Peto 1981, Wald 1988, Ziegler 1989). Sie dienen in Pflanzen als Lichtfilter und Farbstoffe und sind an der Energieübertragung beteiligt (Stahl 1996, Clinton 1998). In der Natur sind über 600 verschiedene Carotinoide bekannt, davon sind mehr als 100 Bestandteile der menschlichen Nahrung. Im Humanserum lassen sich über 20 verschiedene Carotinoide differenzieren (Chug-Ahuja 1993). In epidemiologischen, tierexperimentellen, *in vitro*-Zellkultur- sowie interventionellen Untersuchungen lieferten verschiedene Carotinoide Hinweise auf anti-kanzerogene Eigenschaften (Reviews in: Clinton 1998, Gerster 1995, 1997). Besonders vielversprechend bezüglich der Tumorprotektion erscheint die Datenlage für die beiden Carotinoide β -Carotin und Lycopin.

Lycopin ist ein essentieller Bestandteil einiger Gemüse wie beispielsweise von Tomaten (*Solanum lycopersicum*). In Routineuntersuchungen ist es das Carotinoid mit der höchsten Konzentration im normalen humanen Serum (etwa 0,5-1,0 μ M). Das am besten untersuchte Carotinoid, β -Carotin (Serumkonzentration etwa 0,3-0,5 μ M), kommt vor allem in Karotten (*Daucus carota*) vor (Parker 1989, Riso 1997, Lowe 1999, Olmedilla 1997). Anders als Lycopin ist β -Carotin ein sogenanntes Provitamin A, es kann also im menschlichen Körper zu Vitamin A metabolisiert werden (Olson 1989). Darüber hinaus wirken Carotinoide anti-oxidativ und schützen so die Zelle vor dem Einfluss freier Radikale, wobei Lycopin die höchste anti-oxidative Potenz aller Carotinoide aufweist (Burton 1984, Di Mascio 1989, Krinsky 1989, Kennedy 1992, Sies 1995, Rao 1998).

Welche weiteren Funktionen Carotinoide im menschlichen Organismus haben, ist weitgehend ungeklärt, ebenso die Beschaffenheit möglicher Rezeptoren, über die sie ihre Wirkungen entfalten (Clinton 1998).

Eine Vielzahl epidemiologischer Untersuchungen zeigt, dass die erhöhte Aufnahme von β -Carotin und Lycopin positiv mit einer erniedrigten Tumorinzidenz korreliert (van Eenwyk 1991, Giovannucci 1995, 1999, van Poppel 1995, Gerster 1997, Gann 1999). Insbesondere sind Carotinoide auch mit einem verringerten Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome assoziiert (Benito 1990, van Poppel 1993, Franceschi 1994, Pappalardo 1997, Caderni 1999, Giovannucci 1999). Die Abschätzung der aufgenommenen Carotinoid-Mengen erfolgt dabei entweder mittels sogenannter Ernährungstagebücher oder durch die Bestimmung der Serum-Carotinoid-Konzentrationen. Probleme solcher Untersuchungen sind die falsche Einschätzung der tatsächlich aufgenommenen Nahrungsmengen und – bestandteile und die nicht eindeutig mögliche Zuordnung von Ursache und Wirkung (van Poppel 1993).

In tierexperimentellen Untersuchungen sind β -Carotin und Lycopin in der Lage, die auf chemischem Wege oder durch Strahlung induzierte Karzinogenese in verschiedenen Organen signifikant zu hemmen (Wang 1989, Bertram 1991, Nagasawa 1995, Kim 1997, Sharoni 1997, Kim 1998), insbesondere auch im Kolon (Temple 1987, Alabaster 1995, Shivapurkar 1995, Narisawa 1996, 1998). Schon 1959 zeigten Forssberg et al. an Mäusen, dass die intra-abdominelle Injektion von Lycopin die Schädlichkeit einer Ganzkörperbestrahlung verringerte (Forssberg 1959). An Ratten kam es unter Lycopin-Supplementierung zu gesteigerter Apoptose in Karzinogen-behandelten Lungenzellen (Liu 2003). Es stellt sich wegen der unterschiedlichen Eigenschaften der Stoffe unter anderem bezüglich Absorption und Metabolismus in Mensch und Tier die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse (Bertram 1991).

Eine Vielzahl von Studien zeigte, dass die Inkubation verschiedener Tumorzelllinien mit Carotinoiden *in vitro* mit einer Proliferationshemmung einhergeht. So wirkten Lycopin und β -Carotin auf humane Karzinomzellen verschiedener Organe (Mamma, Lunge, Endometrium) proliferationshemmend

(Levy 1995, Li 2002). An humanen Kolonkarzinomzelllinien zeigte β -Carotin anti-proliferative Effekte (Onogi 1998, Palozza 2002 [11]). In einem Teil der Studien geht die Hemmung der Proliferation unter Carotinoiden mit einer Steigerung der Apoptose einher (Briviba 2001, Palozza 2003). Schließlich beeinflussen Carotinoide *in vitro* in Tumorzellen die Differenzierung (Gerster 1995, Hazuka 1990, Amir 1999) sowie die DNA-Synthese (Onogi 1998).

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich zunehmend mit dem Einfluss von Carotinoiden auf die Expression verschiedener an der Zellzykluskontrolle beteiligter Proteine, um mögliche Mechanismen der anti-proliferativen Carotinoid-Wirkungen zu klären. Die Expression verschiedener Proteine (cdk2, p21, p27, p53, anti-apoptotisches bcl-2 und bcl-x_l) wurde dabei in unterschiedlichen humanen Karzinomzelllinien durch Inkubation mit Carotinoiden in einem Teil der Studien moduliert, wobei die Ergebnisse teils widersprüchlich sind (Nahum 2001, Palozza 2002 [11, 593]).

In vivo konnte gezeigt werden, dass β -Carotin zu einem Rückgang sogenannter *early biomarkers* bei der Tumorentstehung im Menschen führt (Garewal 1990, Stich 1991, van Poppel 1993, Meyskens 1995). In verschiedenen breit angelegten Interventionsstudien erbrachte eine β -Carotin-Supplementierung jedoch keine tumorprotektiven Effekte (Greenberg 1994, Hennekens 1996, MRC/BHF Heart Protection Study Collaborative Group 2002). In zwei weiteren großen Studien fand sich schließlich sogar eine direkt-proportionale Korrelation von β -Carotin mit der Entstehung von Tumoren. So kam es in der ATBC-Studie mit über 23.000 Personen unter den männlichen Rauchern des Studienkollektivs zu einem Anstieg der Rate an Bronchialkarzinomen um 18% (The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group 1994). Auch in der CARET-Studie (*US Carotene and Retinol Efficiency Trial*) stieg die Inzidenz von Lungenkarzinomen unter β -Carotin-supplementierten Rauchern an (Omenn 1996).

Eine seit langem bekannte Eigenschaft von Carotinoiden ist ihre anti-oxidative Wirkung (Burton 1984, Di Mascio 1989, Krinsky 1989, Kennedy 1992, Sies 1995, Rao 1998, Lowe 1999, Riso 1999). Die Aktivität von

Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, die an Proliferation und Apoptose beteiligt sind, ist unter anderem vom Redoxstatus und damit auch vom Verhältnis zwischen Oxidantien und Antioxidantien abhängig (Sen 1996). Palozza et al. wiesen in humanen Kolonkarzinomzelllinien (LS-174, WiDr) sowie in leukämischen Zellen (HL-60) nach, dass die β -Carotin-vermittelte Proliferationshemmung mit einer erhöhten DNA-Bindungsaffinität von NF- κ B und einer vermehrten Expression von c-myc, einem NF- κ B-gesteuerten Protoonkogen, einhergeht, was in einer gesteigerten Apoptose resultiert. Diese Effekte wurden über eine Modifikation des NF- κ B-Redoxstatus erreicht, was einen weiteren möglichen Wirkungsmechanismus von Carotinoiden darstellt. (Palozza 2003 [381])

Eine mögliche Erklärung für die oben genannten pro-kanzerogenen Carotinoid-Effekte bei Rauchern ist, dass β -Carotin mit der Gasphase des Zigarettenrauchs reagiert und radikale Addukte bildet, welche dann mit Sauerstoff zu einem Carotin-Peroxy-Radikal mit pro-oxidativen Eigenschaften reagieren können (Truscott 1996, Liebler 1996). Abhängig von der jeweiligen biologischen Umgebung und deren Redoxstatus scheinen Carotinoide entweder anti- oder pro-oxidativ wirken zu können (Palozza 2003 [353]). Lowe et al. untersuchten *in vitro* den Einfluss von β -Carotin und Lycopin auf oxidativ induzierte DNA-Schädigung und die Membranintegrität von HT-29-Zellen. Es zeigte sich, dass beide Carotinoide in Konzentrationen bis 3 μ M protektiv wirkten, dass sich dieser Schutzeffekt jedoch bei höheren Konzentrationen verlor und beide Carotinoide im Gegenteil sogar noch zusätzliche Schädigungen der DNA bewirkten (Lowe 1999). Eine eindeutige Beantwortung der Frage nach der Unbedenklichkeit einer Einnahme von Carotinoiden zur Tumorprävention kann folglich noch nicht gegeben werden.

Für eine Vielzahl weiterer Faktoren und Mechanismen fanden sich in Untersuchungen Hinweise auf eine Rolle an den tumorprotektiven Effekten verschiedener Carotinoide. Genannt seien beispielsweise der *insulin-like growth factor* (IGF) (Karas 2000, Liu 2003), die an der interzelluläre Kommunikation beteiligte *gap junction*-Untereinheit connexin43 (Zhang 1992, Bertram 1995,

Stahl 2000), die Modifikation von Cytochrom-P450-Enzymen (Lotan 1999), die Modulation der Cholesterolsynthese (Fuhrmann 1997, Elson 1999) sowie die Verminderung der Zahl von DNA-Strang-Brüchen (Pool-Zobel 1997). Daneben wurde gezeigt, dass die Expression des ras-Onkogens sowie die Bildung von IL-1 α , TNF α , polyklonalen Antikörpern und CD4+-T-Lymphozyten durch Carotinoide verändert wird (Lai 1993, Okai 1996, Kazi 1997).

Über die weitere Verstoffwechslung der Carotinoide *in vivo* ist wenig bekannt. Hier liegen weitere mögliche, indirekte Wirkmechanismen von β -Carotin und Lycopin. Schon 1925 wurde gezeigt, dass das aus β -Carotin gebildete Vitamin A tumorprotektiv wirken kann (Wolbach 1978).

Die tumorprotektive Wirkung einer an Carotinoiden reichen Ernährung, auf die eine Vielzahl epidemiologischer Untersuchungen hinweist, lässt sich darüber hinaus möglicherweise durch Effekte erklären, für die nicht eine Substanz alleine ursächlich ist (Heber 2002). Mögliche Wechselwirkungen zwischen einzelnen Carotinoiden bzw. mit anderen Substanzen einer obst- und gemüsereichen Ernährung wie beispielsweise Retinoiden, α -Tocopherol, Vitamin C und D sowie anderen sekundären Pflanzenstoffe wie Flavonoiden, über die bisher nur wenig bekannt ist, könnten eine Rolle spielen. Wahlqvist et al. stellten so unter einer 24-monatigen Supplementierung mit β -Carotin sowohl einen signifikanten Anstieg der β -Carotin- selbst als auch der Lycopin-Konzentration im Serum der Studienteilnehmer fest (Wahlqvist 1994).

Zur Identifizierung möglicher molekularer Mechanismen tumorprotektiver Carotinoid-Effekte wurde in dieser Arbeit zunächst untersucht, ob β -Carotin und Lycopin Einfluss auf die Proliferation zweier humaner Kolonkarzinomzelllinien haben. Dann wurde möglichen Veränderungen im Expressionsmuster von an der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteinen nachgegangen und die Effekte der Carotinoide auf die Expression zweier nukleärer Hormonrezeptoren untersucht.

1.4 Ballaststoffe und Butyrat

Ballaststoffe sind Kohlenhydrate (Nicht-Stärke-Polysaccharide) und Lignin, die unverdaut bis in das distale Kolon gelangen. Bereits 1971 beschrieb Burkitt, ausgehend von Beobachtungen in Ostafrika, dass eine ballaststoffreiche Ernährung mit einer erniedrigten Inzidenz kolorektaler Karzinome assoziiert ist (Burkitt 1971). Er formulierte die Hypothese, dass Ballaststoffe die Stuhlmasse vergrößern, auf diese Weise mögliche Karzinogene verdünnen und die Stuhltransitzeit verkürzen, und dass so weniger Kontaktzeit zwischen den luminalen Karzinogenen und der Mucosa besteht (Kim 2000). Eine Reihe anderer Mechanismen kommen in Frage. Ballaststoffe könnten Karzinogene direkt binden (Roberton 1991). Sie senken den fäkalen pH-Wert, was zu verminderter Löslichkeit freier Gallensäuren führt und so theoretisch die Tumorprogression durch sekundäre Gallensäuren verhindert (Bruce 1987). Auch könnte eine bakterielle Degradation normaler Stuhlbestandteile durch die Darmflora zu Karzinogenen verhindert werden (Harris 1993). Ein weiterer möglicher Mechanismus der protektiven Ballaststoffwirkung sind Veränderungen der Mikroflora des Darms. Mikrobielle Enzyme, die in der Karzinogenaktivierung eine Rolle spielen, könnten inhibiert werden (Goldin 1976), und über eine Stimulierung des Bakterienwachstums würde die Stuhlmasse zunehmen und so die Kontaktzeit verringern (Stephen 1980). Schließlich wird den kurzkettigen Fettsäuren (*short chain fatty acids*, SCFA) eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Sie entstehen als Nebenprodukt bei der bakteriellen Fermentation unverdauter Kohlenhydrate, einem Hauptbestandteil der Ballaststoffe, durch Anaerobier im Kolon (Scheppach 1995). Es handelt sich vor allem um Butyrat, Acetat und Propionat. Dem gesunden Kolonepithel dient Butyrat ($C_4H_8O_2$), vor Glutamin und Glucose, als primäre Energiequelle und stimuliert das Wachstum der Kolonschleimhaut *in vivo* (Roediger 1982, Sakata 1987, Scheppach 1994, Young 1995). Im Kolonlumen liegt es in einer Konzentration von etwa 13-19mM vor (Cummings 1981). In Kolonkarzinomzelllinien senkt es dagegen *in vitro* die Proliferation und induziert deren Differenzierung (Barnard 1993, Hague 1993, Gamet 1992, Basson 1996). Auch die Apoptose, der programmierte Zelltod, wird durch

Butyrat induziert (Hague 1995, Ruemmele 1999, Chai 2000, Crew 2000). Dabei scheint eine gesteigerte Differenzierung der Zellen unter Butyrat-Inkubation der Apoptose voranzugehen (Heerdt 1994). Außerdem wird unter Butyrat die Expression von Zelladhäsionsmolekülen verringert (Basson 1996). Tierexperimentelle Untersuchungen lieferten entsprechende Ergebnisse (McIntyre 1991, 1993). Schließlich konnte gezeigt werden, dass Patienten mit kolorektalen Tumoren niedrigere fäkale Butyratspiegel aufweisen als gesunde Vergleichspersonen (Weaver 1988).

Während in mehreren Interventionsstudien eine ballaststoffreiche Kost keinen protektiven Effekt bezüglich der Rekurrenz von Dickdarmadenomen hatte (Alberts 2000, Bonithon-Kopp 2000, Schatzkin 2000) und auch in der breitangelegten Nurses' Health Study erhöhte Ballaststoffaufnahme nicht mit einer erniedrigten kolorektalen Tumorinzidenz korrelierte (Fuchs 1999), zeigten andere Studien sehr wohl eine positive Korrelation von Ballaststoffaufnahme zu vermindertem Auftreten von Dickdarmadenomen bzw. -karzinomen (Bingham 2003, Peters 2003).

Vermittelt werden die tumorprotektiven Effekte von Butyrat offensichtlich über verschiedene Mechanismen. Die Expression einer Reihe von Faktoren der Zellzyklusregulation wie Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (cdk2, cdk4) und deren Inhibitoren (p21, p27) wird *in vitro* durch Butyrat moduliert (Siavoshian 1997, Palmer 1997, Archer 1998). Des Weiteren beeinflusst Butyrat verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 und c-myc (Souleimani 1993, Thompson 1998, Giardina 1999, Inan 2000, Lührs 2002) und verändert das Aktivitätsniveau von stressaktivierten Kinasen wie ERK, p38 und JNK (Witt 2000).

Das Gros der Effekte, die Butyrat auf die Genexpressionsmodulation hat, dürfte die Inhibierung der Histondeacetylase (HDAC) sein, auf die im Kapitel 1.5 nochmals ausführlicher eingegangen werden wird.

Von wachsendem Interesse ist hier auch die Interaktion mit Signalwegen, die ebenfalls durch Nahrungsbestandteile aktiviert und moduliert werden, vor allem die große Gruppe nukleärer Hormonrezeptoren, die in Kapitel 1.6 ausführlicher erörtert werden.

Die Effekte von Butyrat auf die Expression zweier Vertreter dieser Gruppe ist ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit.

1.5 Histondeacetylase und Trichostatin A

Wachstum, Differenzierung und Tod von Zellen unterliegen einer Vielzahl von Steuerungs- und Regulationsmechanismen. Dabei ist die Zugänglichkeit der Zelle zu solchen regulierenden Faktoren unter anderem davon abhängig, in welchem Zustand sich die DNA befindet. So führt die Acetylierung von Lysinresten der Core-Histone zur Relaxierung der Chromatinstruktur, wodurch das transkriptionelle Potential der DNA gesteigert wird (Csordas 1990, Norton 1989). Deacetylierung führt zur Senkung der transkriptionellen Aktivität (Kuo 1998). Die Acetylierung von Histonen wird durch die Histonacetyltransferasen (HAT), ihre Deacetylierung durch die Histondeacetylases (HDAC) vermittelt. Die Acetylierung führt zur Dekondensation des Chromatins im Bereich der Promotorregionen bestimmter Gene, dies aktiviert die Transkription dieser Gene. Eine Beeinflussung der Histonacetylierung hat mittlerweile auch die therapeutischen Prinzipien der Hämatologie und Onkologie erreicht. Synthetische HDAC-Inhibitoren wie Vorinostat und Panobinostat sind mittlerweile in klinischen Studien zur Behandlung hämatologischer Systemerkrankungen ebenso in Erprobung wie zur Therapie solider Tumore wie dem hepatozellulären Karzinom, wenn sie auch noch kein allgemeingültiges Therapieprinzip darstellen.

Das ursprünglich als Fungizid verwendete Trichostatin A (TSA) ist in der Lage, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* über eine Hemmung der HDAC die Histonacetylierung zu steigern (Yoshida 1990), so die Struktur von Nukleosomen und Chromatin zu verändern und letztlich die Affinität der nukleosomalen DNA für Transkriptionsfaktoren zu steigern (Thomas 1999, Gibson 2000). In Leukämiezellen induziert es so die Differenzierung (Yoshida 1987); in Fibroblasten von Ratten inhibiert es die Progression des Zellzyklus (Yoshida 1988).

Es wurde gezeigt, dass Butyrat in analoger Weise zu TSA die HDAC inhibiert und so zu einer relativen Hyperacetylierung von Histonproteinen führt und damit

die DNA zugänglicher für Transkriptionsfaktoren wird (Sealy 1978). So bewirkt Butyrat durch die Hyperacetylierung von Histonen die Induktion von p21 und Gadd45 und induziert die Differenzierung und / oder Apoptose von Karzinomzellen (Sowa 1997, Archer 1998, Uesugi 1999). Siavoshian et al. konnten zeigen, dass Butyrat und TSA in HT-29-Zellen teilweise identische, teilweise aber auch differente Effekte auf Proliferation, Differenzierung und die Expression von Zellzyklusregulatoren wie p21 und Cyclin D3 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene hatten. (Siavoshian 2000) Diese und andere Ergebnisse legen nahe, dass Butyrat seine Wirkung zum Teil wie TSA über die Inhibierung der HDAC ausübt (Riggs 1977, Cousens 1979). Die Unterschiede in den Wirkungen lassen sich mit der kürzeren Halbwertszeit von TSA im Vergleich zu Butyrat erklären.

1.6 Nukleäre Hormonrezeptoren

Die Gruppe der nukleären Hormonrezeptoren umfasst strukturell verwandte intrazelluläre Rezeptoren für Glucocorticoide (Glucocorticoidrezeptor, GR), Androgene (AR), Östrogene (ER), Mineralocorticoide (MR), Thyroidhormone (TR), Vitamin D (VDR) und Vitamin A (Retinsäure) (RAR). Außerdem gehören zu dieser Gruppe Rezeptoren, deren endogene, physiologische Liganden bisher nicht bekannt sind (*orphan receptors*) (Ribeiro 1995). Es handelt sich um einfache Polypeptidketten, die eine Liganden-bindende, eine DNA-bindende sowie eine genaktivierende Domäne besitzen. Für die Untergruppe der Rezeptoren, die zum TR-Typ gehören, gilt, dass sie nach Binden eines Liganden einen heterodimeren Komplex mit dem 9-*cis*-Retinsäure-Rezeptor (RXR) bilden und sich dann an Response-Elemente in der Promotorregion eines Zielgens anlagern (Yu 1991). Dies geht mit Änderungen der Konformation beider Dimerisierungspartner einher. Solchermaßen DNA-gebundene Rezeptoren beeinflussen schließlich die Transkription nahegelegener Gene in positiver oder auch negativer Weise. Rezeptoren, an die keine Liganden gebunden sind, unterdrücken die Expression ihrer Zielgene (Ribeiro 1995). Darüber hinaus können diese Rezeptoren auch mit anderen Nicht-Rezeptor-Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*activator protein 1*) und NF-κB in

Wechselwirkung treten und so die Transkription von Genen beeinflussen, ohne selbst an die DNA zu binden (Gottlicher 1998). Dieser Mechanismus wird *cross talk* genannt.

1.6.1 RXR α (*retinoid X receptor alpha*, 9-*cis*-Retinsäure-Rezeptor alpha)

Retinsäure (RA), all-*trans*-Retinsäure (ATRA), 9-*cis*-Retinsäure (9-*cis*-RA) und andere Vitamin-A-Derivate sowie verwandte synthetische Strukturen werden unter dem Begriff Retinoide zusammengefasst (Sporn 1976). Retinoide spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, in der Physiologie des Sehens, bei der Aufrechterhaltung der Homöostase, bei der Zellproliferation und bei der Zelldifferenzierung (Dyson 1995, Lippman 2000). Verschiedene Retinoide finden Anwendung in der Chemoprävention von Tumoren bzw. Tumorrezidiven der Haut, der Leber und der Brust sowie in der Therapie von Psoriasis, Akne und Photoaging (Decensi 2000, Lippman 2000, Thacher 2000). In klinischen Studien vermochten Retinoide die Inzidenz von Rezidivtumoren zu senken (Dragnev 2000).

Bisher wurden sechs verschiedene Rezeptoren entdeckt, über die Retinoide ihre Wirkungen ausüben: Die Gruppe der Retinsäurerezeptoren (RAR) und die Gruppe der 9-*cis*-Retinsäure-Rezeptoren (RXR) mit den jeweiligen α , β und γ bezeichneten Untertypen. An RAR binden ATRA und 9-*cis*-RA, an RXR dagegen nur 9-*cis*-RA (Chambon 1996). Daneben gibt es eine Reihe anderer, z.T. spezifischer synthetischer Liganden. RXR α kann sowohl als Homodimer (RXR α -RXR α) wirken als auch als Heterodimer mit anderen nukleären Hormonrezeptoren (z.B. RXR α -VDR) (Lippman 2000). Auf diese Weise wirkt RXR α an einer Vielzahl von Regulationsvorgängen mit.

1.6.2 PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

Tontonoz et al. identifizierten in Adipozyten einen neuen Transkriptionsfaktor, den sie ARF6 nannten und der sich als der heterodimere Komplex RXR α -PPAR γ herausstellte (Tontonoz 1994). PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) gehören ebenfalls zur Gruppe der nukleären

Hormonrezeptoren. Drei Untertypen der PPARs werden unterschieden: PPAR α , PPAR β (auch: PPAR δ , NUC1 oder FAAR) sowie PPAR γ (Schoonjans 1997). Sie werden so genannt, weil das zuerst entdeckte PPAR α durch Stoffe aktiviert wird, die zu einer Mengen- und Größenzunahme von Peroxisomen im Zellkulturversuch führen (Isseman 1990). Drei verschiedene Isoformen von PPAR γ -mRNA wurden bisher beschrieben (α , β , γ), die in bisher nicht spezifizierter Weise zwei Proteinprodukte liefern: PPAR γ 1 und γ 2 (Rocchi 1999). Eine Reihe von Verbindungen, die an PPAR γ binden, ist bekannt: Verschiedene mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Laurylsäure, Linolensäure und Arachidonsäure (Kliwer 1997); verschiedene Eicosanoide wie Prostaglandin D₂ und das Prostaglandinderivat 15-Desoxy- Δ 12,14-PGJ₂ (15d-PGJ₂) (Yu 1995, Forman 1995); die Gruppe der in der Therapie des Typ 2-Diabetes als Insulinsensitizer verwendeten synthetischen Thiazolidindione (Glitazone) wie Rosiglitazon und Troglitazon (Lehman 1995); sowie eine Reihe von Cyclooxygenase- (COX-) Inhibitoren wie Indomethazin und Ibuprofen (Lehman 1997).

Am stärksten exprimiert wird PPAR γ im Fettgewebe, wo PPAR γ -Liganden eine verstärkte Differenzierung der Adipozyten induzieren (Tontonoz 1994, Spiegelman 1996, Auboeuf 1997). Daneben scheint es in eine Reihe weiterer physiologischer Vorgänge involviert zu sein wie Embryonalentwicklung, Glucosehomöostase, Entzündungsprozesse und Karzinogenese (Chawla 1994, Rocchi 1999, Clarke 1999, Barak 1999). Das Screening von humanem Biopsiematerial verschiedener Organe auf das Vorkommen von PPAR γ -mRNA ergab die höchsten Werte für Fettgewebe und den Dickdarm (Fajas 1997). DuBois et al. konnten zeigen, dass verschiedene humane Kolonkarzinomzelllinien mehr PPAR γ exprimieren als normale Kolonmukosa (DuBois 1998). In HT-29-Zellen ging vermehrte Differenzierung mit einer verstärkten Expression von PPAR γ einher (Lefebvre 1999). In verschiedenen humanen Karzinomzelllinien, darunter HT-29- und SW-480-Zellen, konnte durch Behandlung mit PPAR γ -Liganden *in vitro* die Proliferation gehemmt und die terminale Differenzierung gefördert werden (Tontonoz 1997, Müller 1998, Brockman 1998, Sarraf 1998, Kitamura 1999).

Die alleinige Aktivierung von RXR α durch spezifische Liganden führt *in vitro* zu einer Reduktion des Tumorwachstums (Thacher 2000). Die Gabe von RXR α -Liganden zusätzlich zu PPAR γ -Liganden resultiert in additiven oder gar synergistischen Effekten (Tontonoz 1997, Mehta 2000, Stoll 2002). *In vivo* wirkten PPAR γ - und RXR α -Liganden in einem Mausmodell synergistisch in Hinblick auf eine Entzündungshemmung bei chemisch induzierter Colitis (Desreumaux 2001).

Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von PPAR γ an der Karzinogenese im Kolon, der genaue Wirkmechanismus ist jedoch unklar.

1.7 Fragestellung dieser Dissertation

Ernährungsfaktoren wie Carotinoide und die kurzkettige Fettsäure Butyrat, die bei der Fermentation ballaststoffreicher Nahrung entsteht, haben in Beobachtungs- wie auch experimentellen *in vitro*-Studien hemmende Effekte auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms gezeigt. Die genauen molekularen Wirkmechanismen sind dabei nur zum Teil verstanden.

In vorliegender Arbeit sollen folgende Fragen untersucht und damit mögliche tumorprotektive Wirkmechanismen von Carotinoiden und Butyrat aufgezeigt werden:

- Beeinflussen Carotinoide wie β -Carotin und Lycopin die Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen *in vitro*?
- Verändert sich das Expressionsmuster von an der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteinen unter Inkubation mit Carotinoiden?
- Wie beeinflussen sowohl Butyrat als auch der Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A die Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen?
- Exprimieren Kolonkarzinomzellen die nukleären Hormonrezeptoren PPAR γ und RXR α , und wird deren Expression möglicherweise durch Carotinoide oder Butyrat modifiziert?

- Welchen Effekt hat im Vergleich hierzu Trichostatin A auf das Expressionsmuster von PPAR γ und RXR α ?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien und Kulturmedien

Drei kolorektale Karzinomzelllinien wurden untersucht.

HT-29-(American Type Culture Collection, ATCC, HTB-38, Rockville, Maryland, USA) wurde 1964 von J. Fogh aus einem gut differenzierten (G1) Primärtumor einer 44-jährigen weißen Patientin isoliert (Fogh 1975).

SW-480 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSZM ACC 313, Braunschweig) wurden aus dem entdifferenzierten (G4, Dukes B) Primärtumor eines 50-jährigen weißen Mannes isoliert (Leibovitz 1976).

SW-620 (ATCC CCL-227) stammen vom selben Patienten wie Zellen der Linie SW-480, jedoch nicht aus dem Primärtumor sondern aus einer Lymphknotenmetastase.

In allen drei genannten Zelllinien liegt das APC-Tumorsuppressorgen (*adenomatous polyposis coli*) in mutierter Form vor (Ilyas 1997).

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung (Heraeus-Brutschrank B5060, Heraeus, Hanau) in 10% FBS Medium inkubiert (HT-29-Zellen: L-Glutamin 1%, Penicillin/ Streptomycin 2%, NEAA 1% und Hapes Buffer 0,4%, Fötale Bovines Serum, FBS 10% in Minimum Essential Medium, MEM [alle: Life Technologies, Eggenstein]; SW-480-Zellen: FBS 10% in MEM; SW-620-Zellen: Penicillin/ Streptomycin 5%, FBS 10% in MEM).

2.1.2 Zellkulturversuche

1 x 10⁷ Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen (Costar, Cambridge, MA, USA) ausgesät und bei 37°C für 72h inkubiert. Um eine Zellwachstumssynchronisation zu erreichen, wurden die Zellen 6h in serumfreiem Medium inkubiert. Nach Ersatz des serumfreien Mediums durch 10% FBS-Medium und weiteren 12h Inkubation wurden die Zellen sodann unter Zugabe der Testsubstanzen für bis zu 72h inkubiert.

Zu den Zeitpunkten 0h, 24h, 48h und 72h wurde der Medienüberstand abpipettiert und die adhärent wachsenden Zellen durch Trypsinierung vom

Kulturflaschenboden abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit 5ml PBS (PBS Dulbecco's, Life Technologies) gewaschen, 4ml Trypsin (Trypsin-EDTA 1%, Life Technologies) in die Kulturflaschen gegeben und dieses nach einigen Sekunden wieder abgesaugt. Nach erneuter Zugabe von Trypsin (3ml) und fünfminütiger Inkubation bei 37°C (außer SW-620-Zellen: vierminütige Inkubation bei Raumtemperatur) wurden die Zellen durch Beklopfen der Zellkulturflasche von der Unterlage abgelöst und die Trypsinierungsreaktion durch Zugabe von 7,5ml 10% FBS-Medium gestoppt. 0,5ml dieser Suspension wurden für die Zellzählung und die Trypanfärbung entnommen, die restlichen Zellen für 10min bei 4°C mit 900 U/min zentrifugiert (Labofuge 400R, Kendro, Hanau). Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension des entstandenen Zellpellets in 10ml PBS wurde erneut für 10min bei 4°C mit 900 U/min zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Das Zellpellet wurde schließlich in 1ml PBS resuspendiert, in ein silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß (Sorenson, West Salt Lake City, Utah, USA) überführt, zentrifugiert (10min, 4°C, 12000 U/min), das Zellpellet in flüssigem N₂ schockgefroren, bei -80°C gelagert und die Zellen im Western Blot weiter analysiert.

Die für die Zellzählung entnommene Zellsuspension wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit ebenfalls 0,5ml Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%, Life Technologies) vermischt und davon 10µl in einer Neubauer-Zellzählkammer ausgezählt. Vitale (Trypan-negativ) und avitale (Trypan-positiv) Zellen konnten hierbei durch ihr unterschiedliches Färbeverhalten unterschieden werden und somit das Proliferationsverhalten der Zellen bestimmt werden.

In den verschiedenen Versuchsreihen wurden folgende Substanzen getestet:

β-Carotin [1-12µM], Lycopin [1-15µM], Butyrat [2-6mM] (alle Sigma-Aldrich, Steinheim) und TSA [500ng/ml] (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Als Lösungsmittel für Lycopin und β-Carotin wurde Tetrahydrofuran 99,9% (THF) mit 0,025% butyliertem Hydroxytoluen (BHT) (Sigma) als Oxidationsschutz verwendet (Bertram 1991, Levy 1995, Iftikhar 1996) und so eine Stammlösung (2mM) angelegt, die für mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt wurde. In einer Reihe von Vorversuchen wurde die einerseits zur Lösung der Carotinoide

ausreichende und andererseits von den Zellen tolerierte THF-Konzentration ermittelt, die in den Zellkulturflaschen dann maximal 1,5% betrug. Die Carotinoid-Versuche wurden unter gedimmtem Licht durchgeführt. Für Butyrat diente Aqua dest. und für TSA Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma) als Lösungsmittel. Als Kontrollsubstanz für die Butyrat-Inkubationsversuche diente unbehandeltes Medium, für die Carotinoid-Versuche wurde eine THF-Lösung (1,5%) und für die TSA-Versuche eine DMSO-Lösung (0,05%) verwendet. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Alle Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten an einer Hood (Gelaire BSB 4, Bio-Flow Technik, Meckenheim) unter möglichst sterilen Bedingungen.

2.2 Western Blot

2.2.1 SDS-PAGE, Blotting und Färbung

(SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

Die Zellpellets wurden in 200µl 4°C kaltem Lysis buffer (Tris-HCL 20mM, EGTA 1mM, Na₃VO₄ 50µM, Aprotinin 0,01 U/mL, Leupeptin 1µg/ml, PMSF 1µM, Elasinal 1mM, Pepstatin 10µg/ml; pH 7,4; alle Chemikalien: Sigma, außer Tris-HCL: Merck, Darmstadt) gelöst und danach für 10sec ultraschallbehandelt (SonoplusGM70, Bandelin, Berlin). Die Lysate wurden dann bei 4°C für 5min bei 7500 U/min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415) und der Überstand in ein neues silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde photometrisch bei 750nm (BioRad DC Protein Assay, BioRad, Hercules, CA, USA; Tecan-Spectra-Spektroskop, Tecan, Crailsheim) gegen eine Rinderalbumin-Standardkurve (BSA Fraction V, Boehringer, Mannheim) ermittelt. 70µl Sample buffer (10% Glycerol, 0,4% Laurylsulfat (SDS), 0,3% Bromphenolblau, 0,2% Pyronin Y; alle: Sigma) in 1 x Stacking buffer (Trisbase 0,5M/L, 0,8% SDS, 20% 2-Mercapto-ethanol; alle: Sigma) wurden zu den Lysaten gegeben, durch Vortexbehandlung mit der Probe vermischt, diese 3min lang auf 95°C erhitzt und danach 5min auf Eis gekühlt.

Proteinproben (10-50µg pro lane) wurden dann mittels SDS-PAGE (Protean II Cell, BioRad) aufgetrennt, wobei die Polyacrylamidkonzentration (Boehringer,

Mannheim) je nach Größe des zu bestimmenden Proteins zwischen 10% und 15% lag. Je höher das Molekulargewicht des gesuchten Proteins dabei war, desto niedriger wurde die Polyacrylamidkonzentration im Gel gewählt.

Zusätzlich wurde in mindestens eine Geltasche 10µl eines farbig markierten standardisierten Proteingemisches (SDS-PAGE Standards, BioRad) geladen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch auf eine PVDF-Membran (Immobilion-membrane, Milipore, Bedford, MA, USA) mittels Elektroblooming bei 400mA überführt (Trans Blot System, BioRad; EC-Apparatus EC 140, EC-Apparatus Co., Holbrook, NY, USA). Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch 5% Trockenmilchpulver (5% Trockenmilchpulver (Fluka BioChemika, Buchs, CH), 0,1% Tween 20 (Sigma), 0,1% Natriumazid (Merck) in TBS (10mM Tris-HCL, 150mM NaCl [Merck]) über Nacht bei 4°C und Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20 (3 x 30sec, 1 x 10min) wurde der Primärantikörper aufgetragen und die Membran für 2h inkubiert. Darauf folgten mehrere Waschgänge mit TBS 0,1% Tween 20 (3 x 30sec, 3 x 15min), ein weiterer Blockierungsschritt in 5% Milchpuffer (30min), und nach erneutem Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20 (2 x 30sec, 1 x 10min) die Inkubation der Blottingmembran mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1h. Nach weiteren Waschungen (3 x 30sec, 2 x 15min) wurde der Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd., Little Chalfont, UK) nachgewiesen. Bei dieser Nachweisreaktion kommt es zu einer HRP-katalysierten Oxidation von Diazylhydrazid und nachfolgender Lichtemittierung, welche durch Belichtung von lichtsensitiven Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham; Fuji Medical X-ray Film, Fuji, Düsseldorf) aufgezeichnet wurde. Die Belichtungszeiten lagen hierbei zwischen 30sec und 30min.

Um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Proteinbahnen zu überprüfen, wurde die Blottingmembran direkt nach dem Blottingschritt nach Waschung in Aqua dest. mit Ponceau S (0,1% Ponceau S in 5% acetic acid, Sigma) angefärbt. Überschüssiges Ponceau S wurde durch mehrere Waschgänge in Aqua dest. entfernt. Nach Beurteilung der Proteinladung konnte die Membran

mittels TBS 0,1% Tween 20 wieder entfärbt und der Antikörperfärbung zugeführt werden.

2.2.2 Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Sie stammen von der Maus (mm) oder vom Kaninchen (rb). Die Antikörper wurden in der aufgeführten Konzentration in BSA-Puffer (6% BSA, 20mM Tris-HCL, 0,5mM NaCl, 0,1% Natriumazid; ph 7,5) gelöst und mit der Blottingmembran bei Raumtemperatur inkubiert. Die HRP-konjugierten Sekundärantikörper stammten im Falle des Maus-Primärantikörpers vom Schaf, im Falle des Kaninchens vom Esel (Amersham). Die Sekundärantikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen gelöst.

Antigen	Herkunft	MW	Zeit	Typ	Verdünnung 1.Antikörper	Verdünnung 2.Antikörper
cdk2	PH#15536	33kD	2h	Mm	1:1000	1:2500
p21^{cip1/waf1}	TL#C24420	21kD	2h	Rb	1:250	1:2500
p27^{kip1}	TL#K25020	27kD	2h	Mm	1:2500	1:5000
p53	ORP#OP43	53kD	2h	Mm	1µg/ml	1:5000
PCNA	ORP#OP66	37kD	2h	Mm	2mg/ml	1:2500
PPAR-gamma	CAL 516555	54kD	2h	Rb	1:2000	1:2500
RXR-alpha	SC-553 D-20	55kD	2h	Rb	1:700	1:10000

Tabelle 1: Verwendete Antikörper im Western Blot. (PH: Pharmingen, San Diego CA, USA; TL: Transduction Laboratories, Lexington, UK; ORP: Oncogene Research Products, Cambridge MA, USA; CAL: Calbiochem, San Diego CA, USA; SC: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

2.3 Statistische Analyse

Mittels SigmaPlot for Windows Version 4.01 (SPSS Inc., San Rafael, CA, USA) und SigmaStat for Windows Version 2.03 (SPSS Inc.) wurden die statistischen Analysen durchgeführt.

Die dargestellten Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0.05$ angenommen, zur Berechnung wurde der Student t-Test eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen unter Inkubation mit Carotinoiden

3.1.1 Lycopin

Die Inkubation von HT-29-Zellen mit Lycopin in einer Konzentration von 2µM führte zu keiner signifikanten Modifikation des Wachstumsverhaltens der Zellen. Unter Lycopin 5 µM kam es nach 72-stündiger Inkubation zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation ($p=0.008$). Bei einer Lycopin-Konzentration von 15µM war bereits nach 24h eine signifikante Wachstumshemmung nachweisbar ($p<0.05$), die nach 48h und 72h fortbestand ($p=0.001$). Dabei zeigte sich unter Lycopin 15 µM eine signifikant höhere Proliferationshemmung im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen ($p<0.05$) (Abb.1).

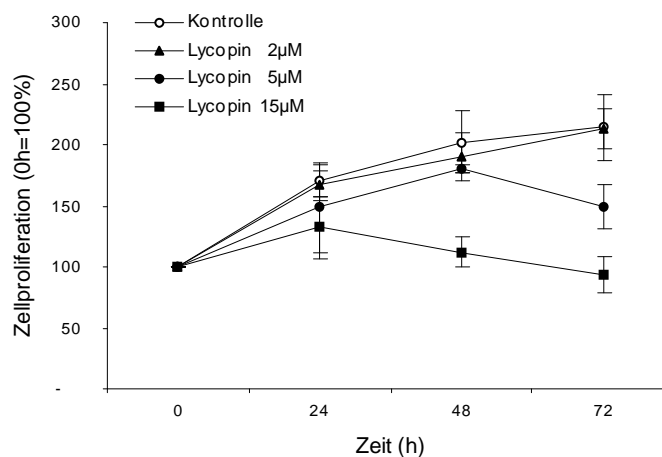


Abb. 1: Proliferation von HT-29-Zellen nach Inkubation mit Lycopin in verschiedenen Konzentrationen und mit der Kontrolle.

3.1.2 β-Carotin

Die Inkubation von HT-29-Zellen mit β-Carotin in einer Konzentration von 2µM führte nach 72h zu signifikanter Hemmung der Zellproliferation ($p<0.05$). Unter β-Carotin 15µM wurde das Zellwachstum bereits nach 24h signifikant gehemmt ($p\leq 0.07$). Auch hier führte β-Carotin in einer Konzentration von 15µM zu einer

signifikant höheren Proliferationshemmung als die niedrigeren Konzentrationen ($\leq 5\mu\text{M}$), jedoch erst nach mindestens 48-stündiger Inkubation ($p \leq 0.04$) (Abb. 2).

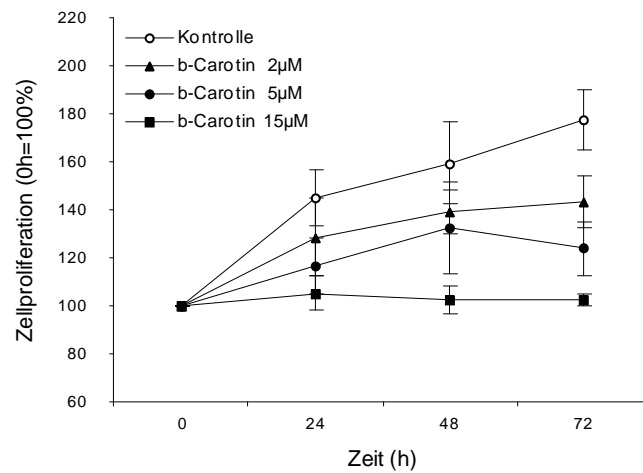


Abb. 2: Proliferation von HT-29-Zellen nach Inkubation mit β -Carotin in verschiedenen Konzentrationen und mit der Kontrolle.

β -Carotin bewirkte schließlich auch in SW-620-Zellen in einer Konzentration von $2\mu\text{M}$ bzw. $5\mu\text{M}$ eine signifikante Veränderung der Proliferation nach einer mindestens 48-stündigen Inkubationsdauer ($p \leq 0.03$). In höherer Konzentration von $15\mu\text{M}$ war β -Carotin auch in SW-620-Zellen bereits nach 24h signifikant anti-proliferativ wirksam, sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber den niedrigeren β -Carotin-Konzentrationen ($p < 0.05$). (Abb. 3)

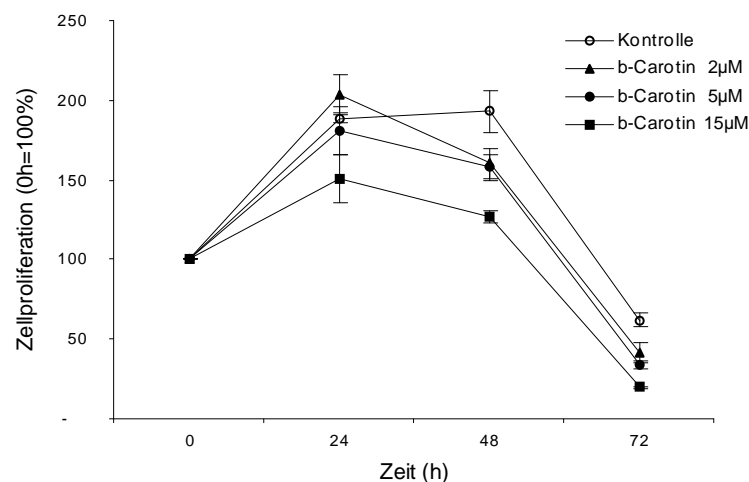


Abb. 3: Proliferation von SW-620-Zellen nach Inkubation mit β -Carotin in verschiedenen Konzentrationen und mit der Kontrolle.

3.2 Beeinflussung der Expression von an der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteinen durch Carotinoide

3.2.1 cdk2

In beiden Kolonkarzinomzelllinien war cdk2 unter Kontrollbedingungen nachweisbar. Unter Inkubation der HT-29-Zellen mit Lycopin änderte sich die Expression von cdk2 nicht (Abb. 4).

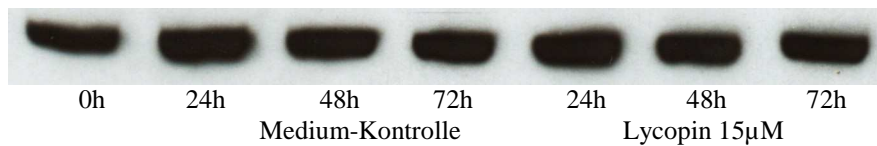


Abb. 4: Western Blot von cdk2 (33kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Lycopin.

β -Carotin hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression von cdk2, weder in HT-29- (Abb. 5) noch in SW-620-Zellen (Abb. 6).

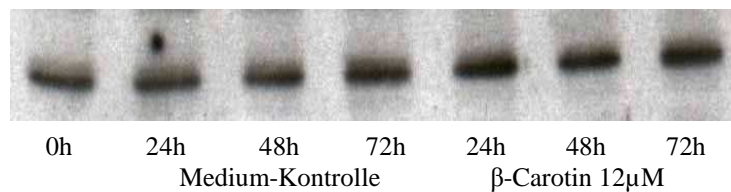


Abb. 5: Western Blot von cdk2 (33kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

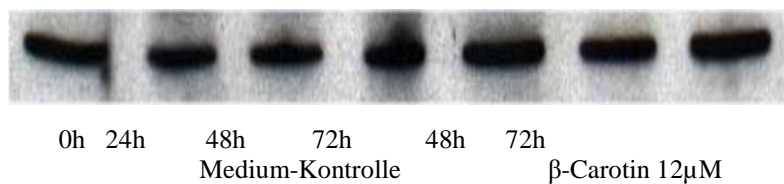


Abb. 6: Western Blot von cdk2 (33kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

3.2.2 p21^{waf/cip1}

In den unbehandelten Kontrollen war kein p21^{waf/cip1} nachweisbar. In HT-29-Zellen hatten weder Lycopin (Abb. 7) noch β -Carotin (Abb. 8), in SW-620-Zellen hatte β -Carotin keinen Einfluss auf die Expression von p21^{waf/cip1} (Abb.9).

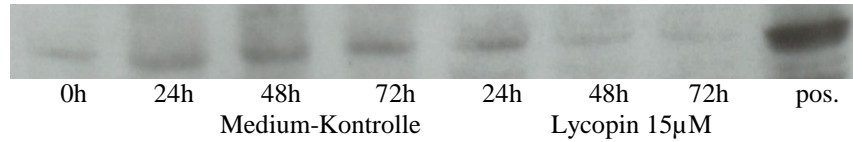


Abb. 7: Western Blot von p21 (21kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Lycopin.

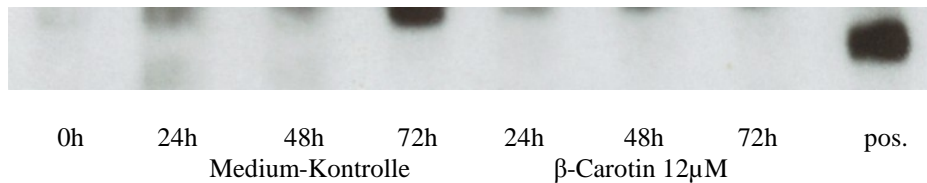


Abb. 8: Western Blot von p21(21kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

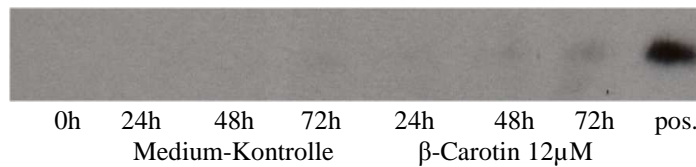


Abb. 9: Western Blot von p21(21kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

3.2.3 p27^{kip1}

Sowohl in HT-29- als auch in SW-620-Zellen wird unter Kontrollbedingungen zeitabhängig vermehrt p27^{kip1} exprimiert. Die Inkubation der Zellen mit Lycopin bzw. β -Carotin verändert dabei das Expression-Muster von p27^{kip1} nicht (Abb. 10-12).

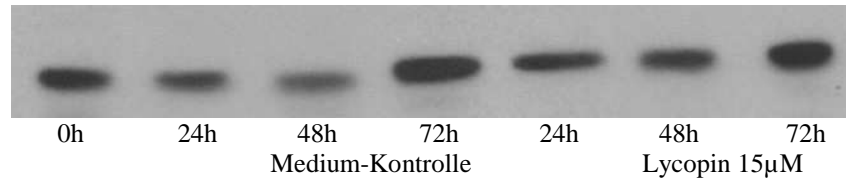


Abb. 10: Western Blot von p27 (27kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Lycopin.

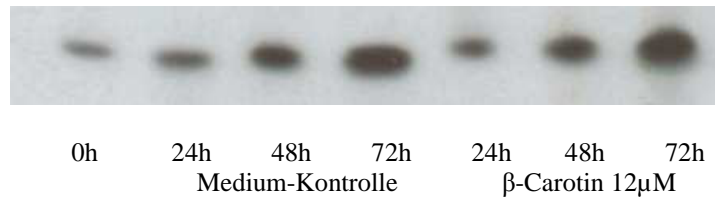


Abb. 11: Western Blot von p27 (27kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

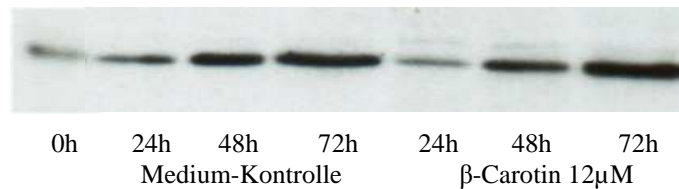


Abb. 12: Western Blot von p27 (27kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

3.2.4 p53

p53 wird unter Kontrollbedingungen in beiden Kolonkarzinomzelllinien exprimiert. Inkubation der HT-29-Zellen mit Lycopin veränderte die Stärke der p53-Expression nicht (Abb. 13); ebensowenig hatte β -Carotin in HT-29-Zellen und SW-620-Zellen einen Einfluss (Abb. 14, 15).

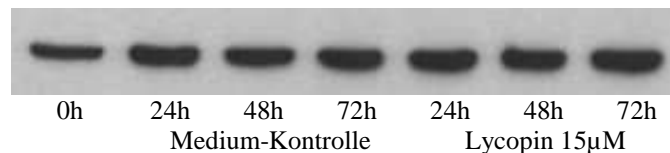


Abb. 13: Western Blot von p53 (53kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Lycopin.

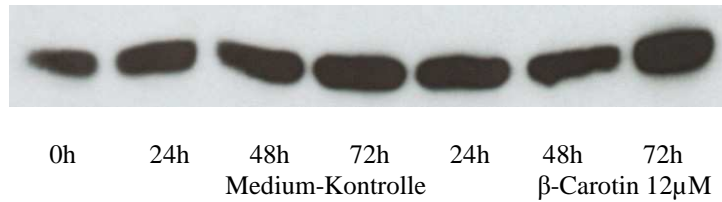


Abb. 14: Western Blot von p53 (53kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

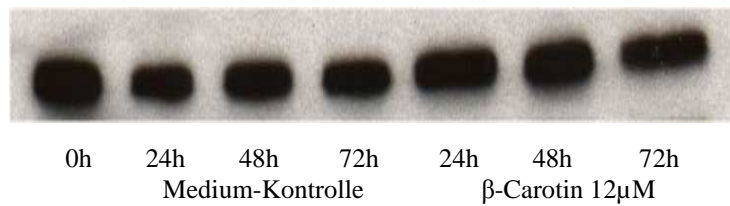


Abb. 15: Western Blot von p53 (53kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

3.2.5 PCNA

In HT-29-Zellen nahm die Expression von PCNA mit zunehmender Inkubationsdauer sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Carotinoid-Inkubation ab (Abb. 16, 17).

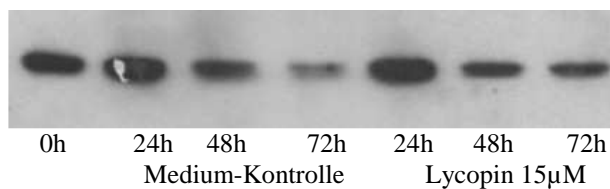


Abb. 16: Western Blot von PCNA (37kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Lycopin.

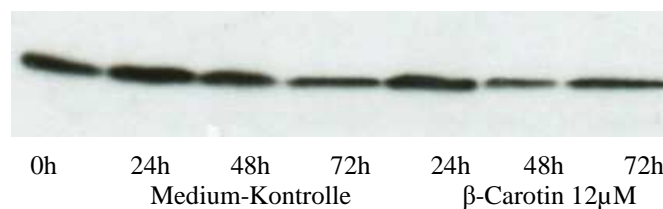


Abb. 17: Western Blot von PCNA (37kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

In SW-620-Zellen beeinflusste β -Carotin die zeitlich konstante Expression von PCNA nicht (Abb. 18).

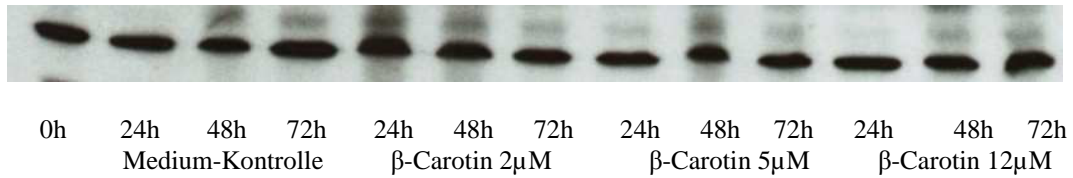


Abb. 18: Western Blot von PCNA (37kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

3.3 Beeinflussung der Expression des nukleären Hormonrezeptors PPAR γ durch Carotinoide

Unbehandelte HT-29-Zellen exprimierten PPAR γ nur in geringstem Maße. Die Inkubation der Zellen mit Lycopin bzw. β -Carotin resultierte in keinem Anstieg der PPAR γ -Expression (Abb. 19, 20).

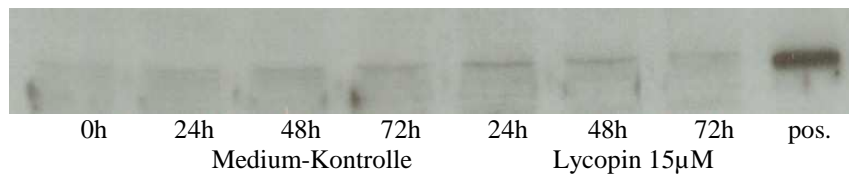


Abb. 19: Western Blot von PPAR γ (54kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Lycopin.

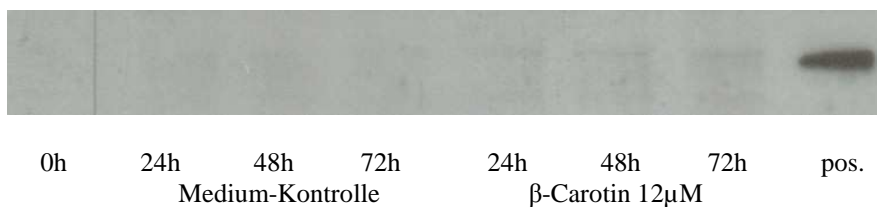


Abb. 20: Western Blot von PPAR γ (54kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

In SW-620-Zellen war PPAR γ sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter β -Carotin-Inkubation schwach nachweisbar (Abb. 21).

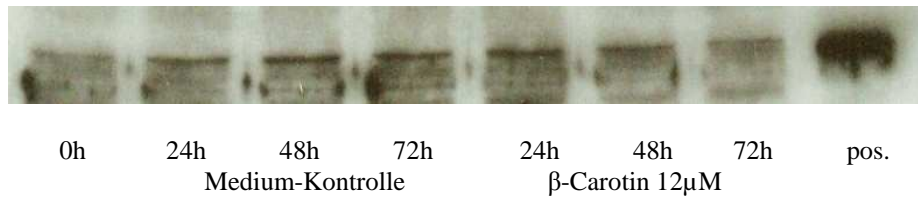


Abb. 21: Western Blot von PPAR γ (54kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und β -Carotin.

Zusammenfassend findet sich eine sowohl zeit- als auch dosisabhängige Proliferationshemmung der untersuchten humanen Kolonkarzinomzelllinien unter Inkubation mit Lycopin und β -Carotin. Die Expression der verschiedenen an der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteine und von PPAR γ wurde durch beide untersuchten Carotinoide nicht entscheidend modifiziert.

3.4 Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen unter Inkubation mit Butyrat und Trichostatin A

Butyrat-Inkubation hemmte die Proliferation von HT-29-Zellen. Unter niedrigeren Konzentrationen ($\leq 4\text{mM}$) war der Effekt nach 48h signifikant ($p \leq 0.02$). Eine höhere Butyrat-Konzentration (6mM) bewirkte bereits nach 24h eine signifikante Proliferationshemmung ($p \leq 0.015$). Nach 72h Inkubation war darüber hinaus der Effekt unter einer höheren Butyrat-Konzentration ($\geq 4\text{mM}$) gegenüber der niedrigeren Konzentration signifikant ($p < 0.01$). (Abb. 22)

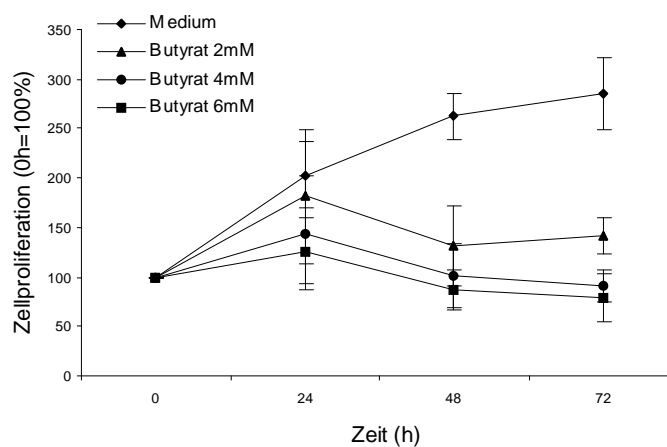


Abb. 22: Proliferation von HT-29-Zellen nach Inkubation mit Butyrat in verschiedenen Konzentrationen und der Kontrolle.

TSA (500ng/ml) führte in ähnlicher Weise zu einer Proliferationshemmung; die Effekte waren bereits nach 24h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant ($p \leq 0.005$) (Abb. 23).

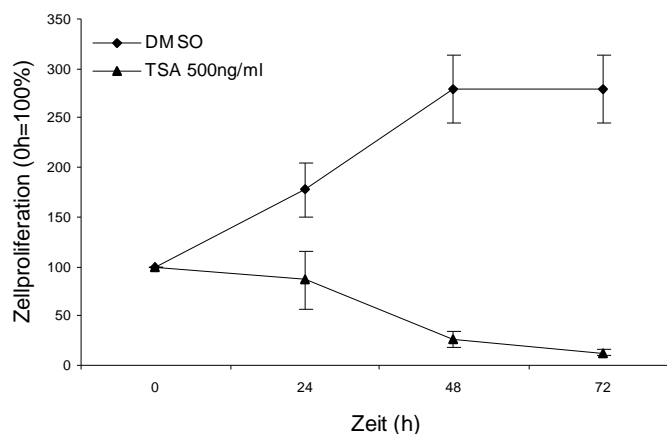


Abb. 23: Proliferation von HT-29-Zellen nach Inkubation mit TSA und mit der Kontrolle.

In SW-480-Zellen hemmte Butyrat ebenfalls die Proliferation. Die Effekte waren auch hier unter niedrigeren Konzentrationen ($\leq 4\text{mM}$) nach 48h signifikant ($p \leq 0.01$), unter höherer Konzentration (6mM) bereits nach 24h ($p < 0.04$). Die Unterschiede unter verschiedenen Butyrat-Konzentrationen waren nicht signifikant. (Abb. 24)

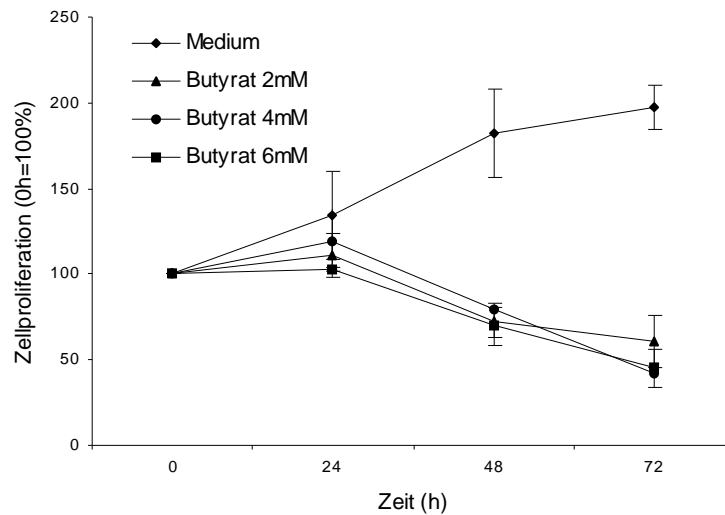


Abb. 24: Proliferation von SW-480-Zellen nach Inkubation mit Butyrat in verschiedenen Konzentrationen und mit der Kontrolle.

In SW-480-Zellen bewirkte TSA (500ng/ml) zeitunabhängig im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Proliferationshemmung ($p \leq 0.03$) (Abb. 25).

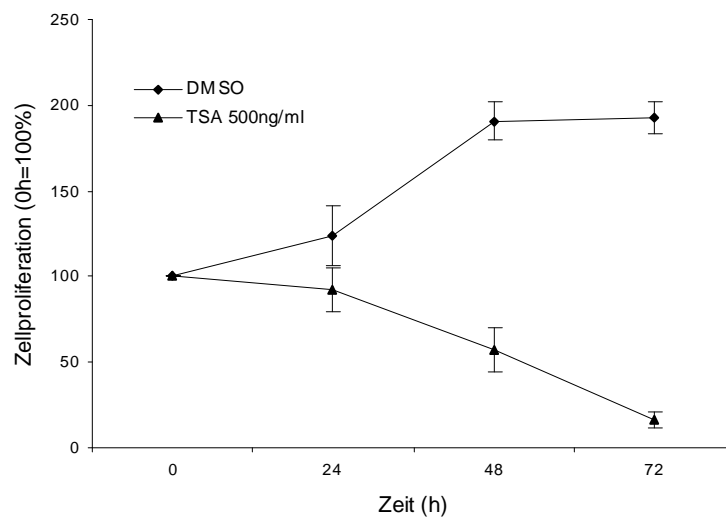


Abb. 25: Proliferation von SW-480-Zellen nach Inkubation mit TSA und mit der Kontrolle.

Dosis- und zeitunabhängig war Butyrat in SW-620-Zellen signifikant anti-proliferativ wirksam im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.05$). Zudem resultierte eine 72-stündige Inkubation der Zellen mit höheren Butyrat-Konzentrationen in einer signifikant stärkerer Wachstumshemmung ($p < 0.02$). (Abb. 26)

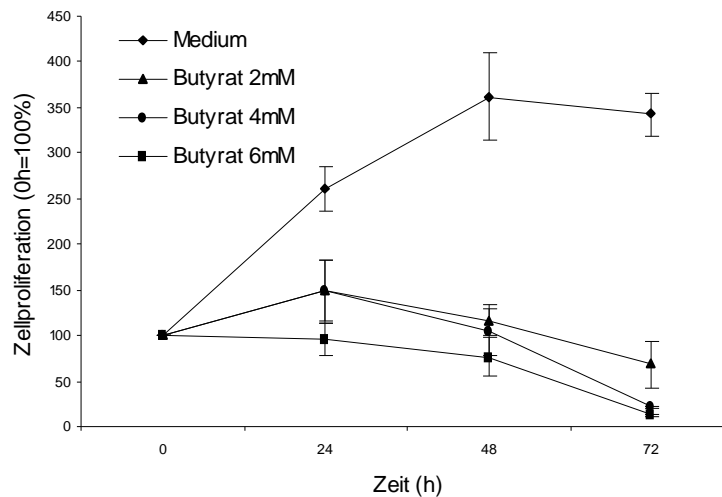


Abb. 26: Proliferation von SW-620-Zellen nach Inkubation mit Butyrat in verschiedenen Konzentrationen und mit der Kontrolle.

TSA (500ng/ml) war schließlich auch in SW-620-Zellen signifikant anti-proliferativ wirksam gegenüber der Kontrolle (Abb. 27).

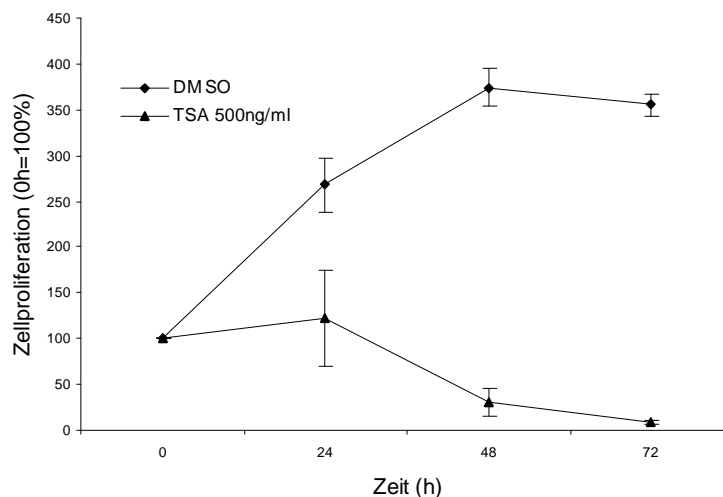


Abb. 27: Proliferation von SW-620-Zellen nach Inkubation mit TSA und mit der Kontrolle.

3.5 Beeinflussung der Expression nukleärer Hormonrezeptoren durch Butyrat

3.5.1 PPAR γ

Unbehandelte HT-29-Zellen exprimierten nur sehr gering PPAR γ . In HT-29-Zellen kam es unter Butyrat 2mM nach 48h zu einer Induktion der PPAR γ -Expression, wobei es unter höherer Konzentration zu einem Anstieg bereits nach 24h kam (Abb. 28).

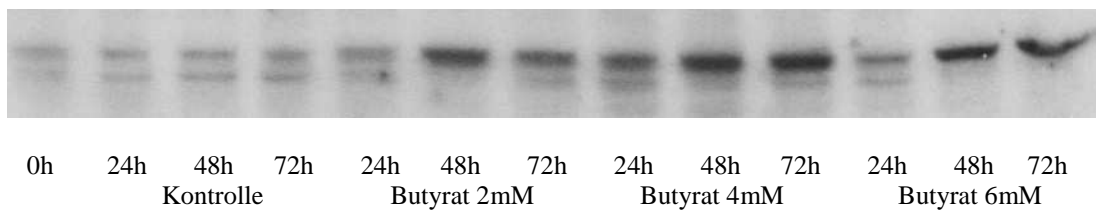


Abb. 28: Western Blot von PPAR γ (54kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Butyrat.

Auch in SW-480-Zellen ließ sich unter Kontrollbedingungen nur sehr gering PPAR γ nachweisen. Unter Butyrat 2mM kam es nach 48h zu einer Induktion der PPAR γ -Expression. Dieser Effekt war unabhängig von der Butyrat-Konzentration (Abb. 29).

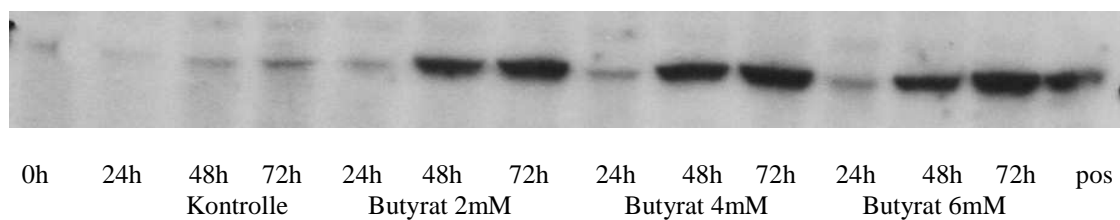


Abb. 29: Western Blot von PPAR γ (54kD) in SW-480-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Butyrat.

SW-620-Zellen exprimierten bereits nach 72stündiger Mediuminkubation PPAR γ -Protein. Unter Butyrat wurde dieses niedrige Niveau bereits nach 48h erreicht. Nach 72h kam es zu einer deutlich verstärkten PPAR γ -Expression. Auch diese Effekte waren dosisunabhängig (Abb. 30).

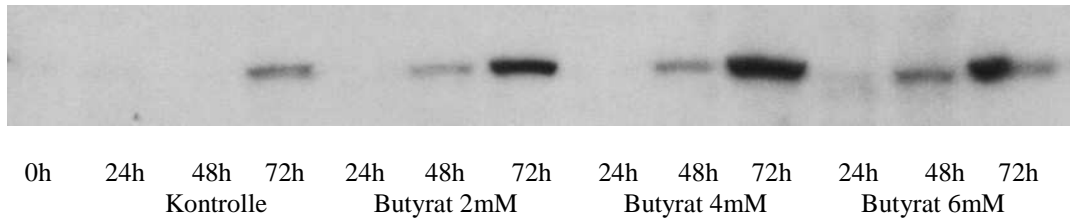


Abb. 30: Western Blot von PPAR γ (54kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Butyrat.

3.5.2 RXR α

In unbehandelten HT-29-Adenokarzinomzellen war RXR α deutlich nachweisbar. Butyrat-Inkubation resultierte in einer schwachen Abnahme der RXR α -Expression. Dieser Effekt war zeitunabhängig bei Konzentrationen ab 2mM nach 24h sichtbar, wobei es bei höheren Konzentrationen (Butyrat 4mM und 6mM) zu einer geringen Verstärkung dieses Effekts kam (Abb. 31).

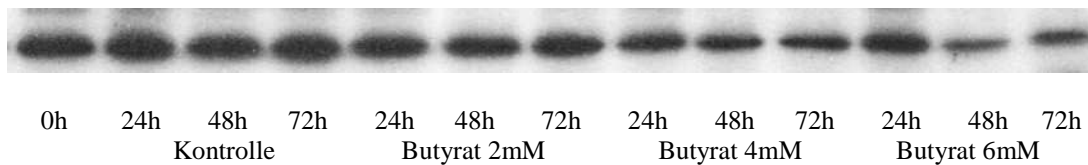


Abb. 31: Western Blot von RXR α (55kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Butyrat.

In SW-480 Zellen kam es unter Butyrat 2mM ebenfalls zu einem Abfall der RXR α -Expression nach 24h. Auch hier führten höhere Butyratkonzentrationen zu stärkeren Effekten, und auch hier geschah dies unabhängig von der Dauer der Inkubation. (Abb. 32)

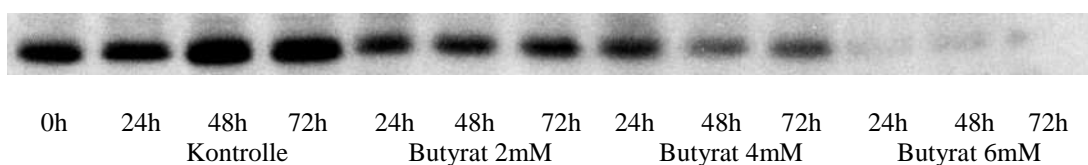


Abb. 32: Western Blot von RXR α (55kD) in SW-480-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Butyrat.

SW-620-Zellen exprimierten unter Kontrollbedingungen ebenfalls RXR α , jedoch kam es hier von einem im Vergleich zu HT-29- und SW-480-Zellen niedrigeren Niveau ausgehend nach 48h und nach 72h zu einem Abfall von RXR α (Abb. 33).

Unter Butyrat $\geq 2\text{mM}$ kam es bereits nach 48h zu einem stärkeren Abfall von RXR α . Nach 72stündiger Inkubation mit Butyrat $\geq 4\text{mM}$ war kein RXR α -Protein mehr nachweisbar.

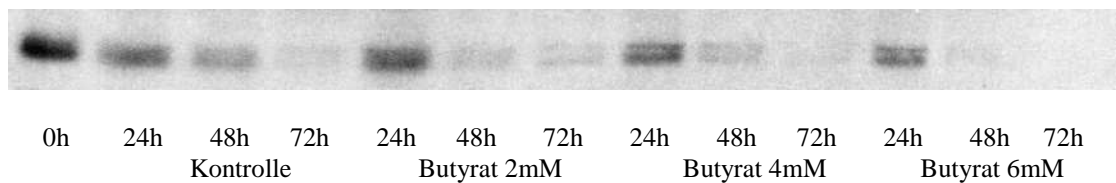


Abb. 33: Western Blot von RXR α (55kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit der Kontrolle und Butyrat.

3.6 Beeinflussung der Expression nukleärer Hormonrezeptoren durch Trichostatin A

3.6.1 PPAR γ

Inkubation von HT-29-Zellen mit Trichostatin A führte bereits nach 24h zu einer deutlichen Induktion der Expression von PPAR γ , wobei der stärkste Effekt nach 48h festzustellen war (Abb. 34). DMSO hatte in allen drei Zelllinien keinen Effekt auf die PPAR γ -Expression.

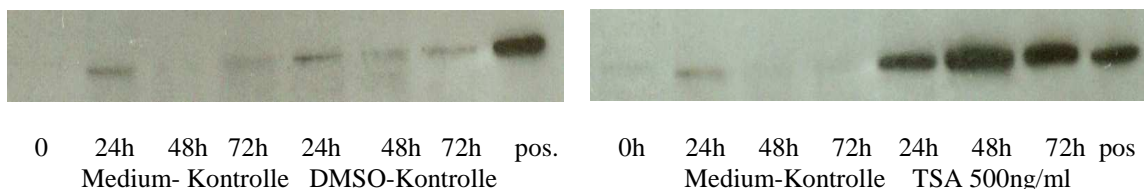


Abb. 34: Western Blots von PPAR γ (54kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit Medium-Kontrolle, DMSO-Kontrolle und Trichostatin A.

In SW-480-Zellen wurde PPAR γ erst nach 48stündiger Inkubation mit Trichostatin A exprimiert, wobei es nach 72h zu einem weiteren Anstieg kam (Abb. 35).

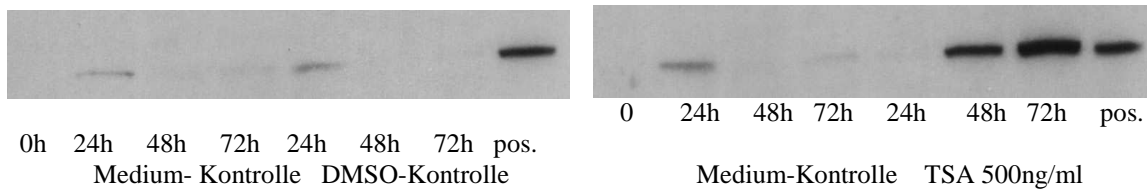


Abb. 35: Western Blots von PPAR γ (54kD) in SW-480-Zellen nach Inkubation mit Medium-Kontrolle, DMSO-Kontrolle und Trichostatin A.

SW-620-Zellen exprimierten PPAR γ unter Kontrollbedingungen nach 72h (vgl. 3.1.2). Unter Trichostatin A kam es bereits nach 48h zur Expression von PPAR γ , 72stündige Inkubation führte zu einer deutlichen Verstärkung dieses Effekts. (Abb. 36)

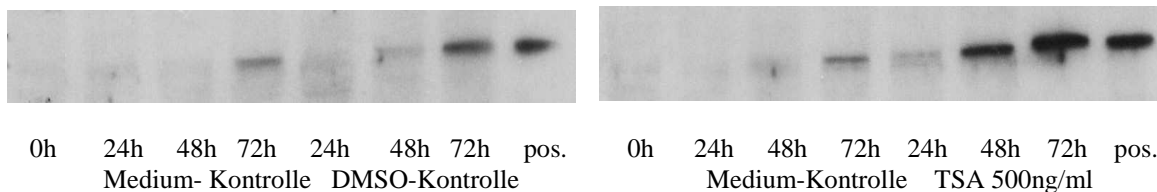


Abb. 36: Western Blots von PPAR γ (54kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit Medium-Kontrolle, DMSO-Kontrolle und Trichostatin A.

3.6.2 RXR α

Unter TSA 500ng/ml kam es bereits nach 24h zu einem deutlichen Abfall der Expression von RXR α in HT-29- (Abb. 37) und SW-480-Zellen (Abb. 38). Längere Inkubationsdauer führte zu noch stärkerem Abfall von RXR α .

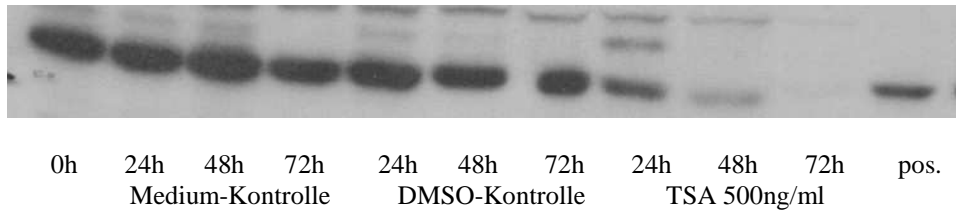


Abb. 37: Western Blot von RXR α (55kD) in HT-29-Zellen nach Inkubation mit Medium-Kontrolle, DMSO und Trichostatin A.

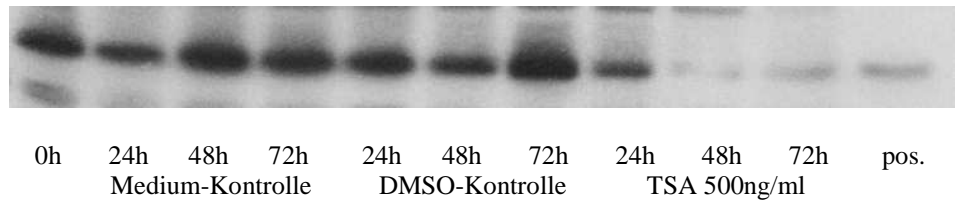


Abb. 38: Western Blot von RXR α (55kD) in SW-480-Zellen nach Inkubation mit Medium-Kontrolle, DMSO und Trichostatin A.

In SW-620-Zellen war der Abfall der RXR α -Expression unter TSA erst nach 48h festzustellen, nach 72h war kein RXR α mehr nachweisbar (Abb.39).

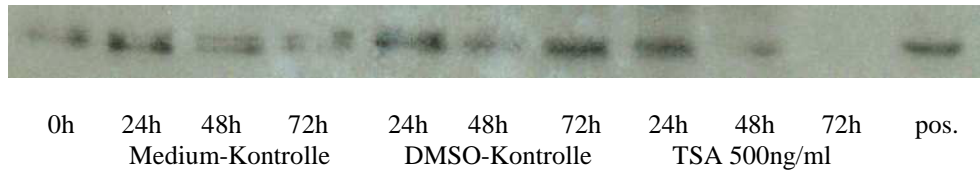


Abb. 39: Western Blot von RXR α (55kD) in SW-620-Zellen nach Inkubation mit Medium-Kontrolle, DMSO und Trichostatin A.

Zusammenfassend führte die Inkubation der humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29, SW-480 und SW-620 zu einer zeitabhängigen Induktion der Expression von PPAR γ , wobei sich an HT-29-Zellen auch eine Konzentrationsabhängigkeit zeigte. In allen Zelllinien war RXR α nachweisbar. Darüber hinaus wurde die Expression von RXR α in diesen Zelllinien durch Butyrat-Inkubation supprimiert; dieser Effekt war unter höheren Butyrat-Konzentrationen verstärkt nachweisbar. Die Inkubation der Zellen mit Trichostatin A führte in gleicher Weise zu einer vermehrten PPAR γ -Expression und zu einer verminderten Expression von RXR α . Hier führten längere Inkubationszeiten zu einer Zunahme der Effekte. (Tab. 2)

	HT-29		SW 480		SW 620	
PPARγ	↑↑ Z+D	↑↑ Z	↑↑ Z	↑↑ Z	↑↑ Z	↑↑ Z
RXRα	↓↓ D	↓↓ Z	↓↓ D	↓↓ Z	↓↓ Z+D	↓↓ Z
	Butyrat	TSA	Butyrat	TSA	Butyrat	TSA

Z: zeitabhängig, **D:** dosisabhängig, **↑↑:** Anstieg, **↓↓:** Abfall

Tab. 2: Einfluss von Butyrat bzw. Trichostatin A auf die Expression von PPAR γ bzw. RXR α in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Lycopin und β -Carotin auf die Proliferation und Genexpression kolorektaler Karzinomzelllinien untersucht. Zudem wurde die Regulation der nukleären Hormorezeptoren PPAR γ und RXR α durch die Inhibitoren der Histondeacetylase Butyrat und Trichostatin A untersucht.

Lycopin hemmte die Proliferation der untersuchten humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 signifikant sowohl zeit- als auch dosisabhängig, β -Carotin wirkte in gleicher Weise sowohl auf HT-29- als auch auf SW-480-Zellen.

Beide Carotinoide beeinflussten nicht das Expressionsmuster der untersuchten, an der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteine (cdk2, p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1}, p53, PCNA) sowie des nukleären Hormonrezeptors PPAR γ .

Sowohl Butyrat als auch Trichostatin A (TSA), beides Inhibitoren der Histondeacetylase (HDAC), hemmten das Wachstum von HT-29-, SW-480- sowie SW-620-Zellen signifikant.

Alle drei humanen Kolonkarzinomzelllinien exprimierten unter Kontrollbedingungen nur gering PPAR γ . Die Inkubation der Zellen mit Butyrat induzierte dann nach 48h dosisunabhängig die Expression von PPAR γ .

In allen drei Zelllinien war in der unbehandelten Kontrolle RXR α nachweisbar. Hier führte die Butyrat-Inkubation zu einem dosisabhängigen Abfall der RXR α -Expression.

In gleicher Weise induzierte TSA zeitabhängig die Expression von PPAR γ und supprimierte die Expression von RXR α .

4.1 Carotinoide

Epidemiologischen Daten zufolge korreliert eine obst- und gemüsereiche Ernährung positiv mit einer verringerten Inzidenz von Tumoren. In einer Reihe

von *in vitro*-Studien führten verschiedene Carotinoide zur Proliferationshemmung von Tumorzellen.

So waren sowohl Lycopin als auch β -Carotin in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien (Mamma, Lunge, Endometrium) mit Konzentrationen im Bereich von 1-20 μ M anti-proliferativ wirksam, wobei die Effekte unter Lycopin deutlicher ausgeprägt waren (Levy 1995). Die Proliferation der humanen Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und Colo 320DM wurde durch β -Carotin in einer Konzentration von 10 μ M signifikant gehemmt (Onogi 1998). In HT-29-Zellen war β -Carotin ebenfalls in einer Konzentration um 10 μ M proliferationshemmend (Briviba 2001, Palozza 2002 [11]). Sowohl β -Carotin als auch Lycopin wirkten in MCF7-Mammakarzinomzellen anti-proliferativ, jedoch erst in Konzentrationen um 60 μ M (Li 2002).

In unseren Untersuchungen führte die Inkubation humaner Kolonkarzinomzelllinien mit Carotinoiden zu einer zeit- und dosisabhängigen Proliferationshemmung. Lycopin führte in HT-29-Zellen ab einer Konzentration von 5 μ M zu einer signifikanten Wachstumshemmung, während β -Carotin in HT-29- und SW-620-Zellen zumindest nach längerer Inkubationsdauer bereits in einer Konzentration von 2 μ M signifikant gegenüber der Kontrolle anti-proliferativ wirksam war.

Unsere Ergebnisse stehen in Konkordanz mit den genannten Daten von Briviba und Palozza (Briviba 2001, Palozza 2002 [11]). Dagegen stehen sie im Gegensatz zu anderen Untersuchungen: Bei Wang et al. blieben sowohl β -Carotin als auch Lycopin in Konzentrationen bis 10 μ M ohne anti-proliferative Effekte auf die humane Kolonkarzinomzelllinie Colo-205 (Wang 1995). In einer weiteren Studie blieb β -Carotin an HT-29-Zellen ebenfalls ohne proliferationshemmende Wirkung (Shultz 1992). Daneben stellten Iftikhar et al. an drei humanen Kolonkarzinomzelllinien, darunter SW-620, keinen anti-proliferativen, sondern einen zytotoxischen Effekt bei einer β -Carotin-Konzentration von 2,9 μ M fest, wobei eine höhere Dichte der Zellen in den Kulturflaschen den zytotoxischen Effekt von β -Carotin verringerte (Iftikhar 1996).

Ohne zusätzliche Carotinoid-Supplementierung liegen die im humanen Serum *in vivo* gemessenen Konzentrationen der untersuchten Carotinoide im Bereich 0,3-0,5µM für β-Carotin bzw. 0,5-1,0µM für Lycopin (Parker 1989, Olmedilla 1997, Riso 1997). Die oben aufgeführten höheren Konzentrationen sind durch gezielte alimentäre Supplementation zu erreichen. So bewirkt die tägliche Gabe von 50mg β-Carotin einen Anstieg des Serum-β-Carotin-Spiegels auf 16,1µM (Nierenberg 1991). In unseren Untersuchungen lagen die Carotinoid-Konzentrationen ebenfalls in diesem unter physiologischen Bedingungen erreichbaren Rahmen.

Die Signalvermittlung über Hormone und Transkriptionsfaktoren sowie die Regulation von Zellzyklusprogression, Differenzierung und Apoptose sind potentielle Wirkorte für anti-karzinogene Substanzen (Sharoni 2003). In unseren Versuchen konnten keine Veränderungen im Expressionsmuster von verschiedenen an der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteine (cdk2, p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1}, p53, PCNA) sowie des nukleären Hormonrezeptors PPARγ unter Inkubation mit β-Carotin und Lycopin in den humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und SW-620 nachgewiesen werden.

Die **cdk2**-Expression war in unseren Versuchen Carotinoid-unabhängig. Nahum et al. konnten an Mamma- und Endometriumkarzinomzellen ebenfalls keine Veränderung im Expressionsmuster dieser Cyclin-abhängigen Kinase unter Lycopin-Inkubation feststellen. Lycopin führte jedoch in seinen Daten zu einer Verringerung der *Aktivität* von cdk2. Dies ist vermeintlich über eine vermehrte Retention von p27 in cdk2-Cyclin E-Komplexen bei gesteigerter Lösung von p27 aus cdk4-Cyclin D-Komplexen vermittelt. (Nahum 2001) Entscheidend für die Aktivität der cdk's im Rahmen der Zellzyklusregulation ist offenbar nicht allein ihre Konzentration und die ihrer Inhibitoren, sondern auch deren Verteilung zwischen verschiedenen Komplexen und das Verhältnis von Aktivatoren zu Inhibitoren im jedem Komplex (Planas-Silva 1997, Sherr 1995). So induziert β-Carotin in Fibroblasten die Bildung von **p21** und führt zu einer

vermehrten Bindung von p21 an cdk4, was mit einer erniedrigten cdk4-Cyclin D(1)-Aktivität einhergeht (Stivala 2000).

Untersuchungen der Wirkung von Carotinoiden auf die Expression von p21 in Karzinomzellen liefern ein uneinheitliches Bild. So zeigt sich unter vergleichbaren β -Carotin-Konzentrationen einerseits ein steigernder (Palozza 2002 [593]), andererseits ein hemmender (Lai 1993) oder, wie in unseren Versuchen, kein Effekt (Williams 2000, Palozza 2002 [11]) auf die Expression von p21. Lycopin führte in einer Studie an Mammakarzinomzellen zu einer verminderten Expression von p21, wobei das Proteinniveau von **p27** unbeeinflusst blieb (Nahum 2001). Während in Leukämiezellen unter β -Carotin vermehrt p27 exprimiert wurde (Palozza 2002 [593]), hatte β -Carotin in humanen Kolonkarzinomzellen, unter anderem Zellen der Linie HT-29, keinen Einfluss auf die Expression von p27 (Palozza 2002 [11]), was sich mit unseren Ergebnissen deckt.

An der oralen Karzinomzelllinie SCC-25 induziert β -Carotin die Expression von **p53** (Wildtyp), wohingegen mutiertes p53 vermindert exprimiert wird (Schwartz 1993). Keinen Einfluss auf die Expression von p53 hatte β -Carotin in einem Hamstermodell *in vivo* (Wolterbeek 1995). In einer Studie an 25 Personen reduzierte eine Mischung verschiedener Substanzen, darunter β -Carotin und Lycopin, die durch UV-Licht in der Haut induzierte Expression von p53 (Cesarini 2003).

Bezüglich des Einflusses von Carotinoiden auf die Expression von **PCNA** liegen lediglich *in vivo*-Untersuchungen vor. β -Carotin führte in einem Nagetiermodell zu verstärkter Expression von PCNA, wobei niedrige Carotinoid-Dosen ohne Effekt blieben (Liu 2000). Lycopin-Gabe resultierte im gleichen Modell in einer Inhibierung des durch Rauch induzierten PCNA-Anstiegs in Alveolarzellen (Liu 2003). β -Carotin-Supplementierung von Probanden hatte in einer weiteren Studie keinen Einfluss auf die Expression von PCNA (Frommel 1995).

Der fehlende Einfluss einer Inkubation mit β -Carotin und Lycopin auf die Expression der genannten Proteine in unseren Versuchen gibt keine Hinweise darauf, dass die anti-proliferativen Effekte der untersuchten Carotinoide in

diesen Kolonkarzinomzelllinien über eine Regulation des Zellzyklus durch die untersuchten Faktoren vermittelt werden. Möglicherweise wird die Carotinoid-assoziierte Proliferationshemmung also auch über andere Mechanismen bewirkt. Weitere Untersuchungen auf Transcriptom- und Proteom-Ebene müssen hier folgen.

Versuche an humanen Prostatakarzinomzellen zeigten, dass Lycopin allein die Proliferation nicht beeinflusst, aber in Kombination mit α -Tocopherol zu einer bis zu 90%-igen Inhibition der Proliferation führt (Pastori 1998). An der Leukämiezelllinie HL-60 war Lycopin als Einzelsubstanz ebenfalls ohne anti-proliferativen Effekt, jedoch verstärkte es deutlich die wachstumshemmende Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und Retinsäure. Die Autoren spekulieren, dass Lycopin entweder die Retinsäure selbst im Zellkulturmedium stabilisiert, oder aber nukleäre Hormonrezeptoren reguliert wie den Retinoid-X-Rezeptor alpha (RXR α), über den Retinsäure wirkt (Amir 1999). So supprimiert β -Carotin in einem Tiermodell die Expression des Retinsäure-Rezeptors beta (RAR β) (Liu 2000). Auch aufgrund der Beobachtung, dass β -Carotin, Lycopin und andere Carotinoide die Aktivierung von Zielgenen des nukleären Hormonrezeptors PPAR γ beeinflussen können, wird über eine Beteiligung der Aktivierung von PPAR γ an den tumorprotektiven Mechanismen dieser Carotinoide spekuliert (Sharoni 2003).

Diesbezüglich untersuchten wir den Effekt von Lycopin und β -Carotin auf das Expressionsmuster von PPAR γ . Es konnte kein Einfluss dieser Carotinoide auf die PPAR γ -Expression nachgewiesen werden.

Es bleibt zu klären, über welche Rezeptoren Carotinoide und ihre Stoffwechselprodukte ihre Wirkungen *in vivo* ausüben.

Neben direkten Effekten auf Tumorzellen darf die Möglichkeit indirekter anti-karzinogener Carotinoid-Wirkungen (z.B. Modulation des Hormon- oder des Immunstatus, der Angiogenese oder des Karzinogen-Metabolismus) nicht außer Acht gelassen werden. Darüber hinaus könnten erhöhte Carotinoid-Konzentrationen auch lediglich Marker für eine „gesunde“, obst- und

gemüsereiche Ernährung bzw. für einen insgesamt „gesunden Lebensstil“ sein, ohne *per se* tumorprotektiv zu wirken (Collins 1998).

Definitive Daten bezüglich Absorption, Verteilung, Metabolismus, biologischer Funktionen, eventueller organspezifischer Wirkungen einzelner Carotinoide, Dosis-Wirkungs-Beziehungen und möglicher Wechselwirkungen der Carotinoide untereinander und mit anderen Pflanzenstoffen wie z.B. Flavonoiden fehlen noch weitestgehend (Clinton 1998). Daneben ruht die Hoffnung auf doppelblinden Interventionsstudien mit großen Kollektiven über lange Zeiträume, um auch Langzeitwirkungen der Carotinoide erfassen zu können.

Es lässt sich somit auch nach 30 Jahren noch sagen, was 1981 der Editor von *Nature* zu Petos grundlegendem β -Carotin-Artikel sinngemäß anmerkte: „*Unvorsichtige Leser sollten nicht große Mengen an Karotten konsumieren im Glauben, dies sei notwendigerweise ein Schutz vor Krebs.*“ (Peto 1981)

4.2 Butyrat

Eine weitere Substanz, der im Zusammenhang mit dem Kolonkarzinom tumorprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden, ist die kurzkettige Fettsäure Butyrat, die bei der bakteriellen Fermentation von Ballaststoffen entsteht.

Butyrat hemmte in unseren Versuchen zeit- und konzentrationsabhängig signifikant die Proliferation der drei untersuchten Kolonkarzinomzelllinien. Dies steht in Einklang mit einer Vielzahl anderer Untersuchungen, in denen Butyrat anti-proliferativ wirkte (Gamet 1992, Barnard 1993, Hague 1993, Basson 1996). Butyrat wurde in unseren Versuchen in Konzentrationen bis 6mM eingesetzt, was noch unter den von Cummings et al. *in vivo* bestimmten Konzentrationen im Kolonlumen von etwa 13-19mM liegt und also physiologisch relevant ist (Cummings 1981).

Der Einfluss von Butyrat auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose kolorektaler Karzinomzelllinien ist seit langem bekannt. Butyrat vermittelt diese

Wirkungen ganz offensichtlich über eine Reihe verschiedener Wege, u.a. durch eine Hemmung der Histondeacetylase (HDAC). Wir inkubierten die Zellen so zusätzlich mit **Trichostatin A** (TSA), einem bekannten HDAC-Inhibitor. In unseren Untersuchungen führte TSA in gleicher Weise wie Butyrat zu einer Inhibierung der Zellproliferation der humanen Kolonkarzinomzelllinien. Somit sind die anti-proliferativen Butyrat-Effekte möglicherweise zumindest zum Teil über eine Hemmung der HDAC vermittelt.

PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) wurde zuerst als ein wichtiger Faktor in der Adipozytendifferenzierung beschrieben (Tontonoz 1994). Besonders stark exprimiert wird PPAR γ im Kolon, wobei differenziertere Zellen eine höhere PPAR γ -Expression aufweisen (Mansen 1996, Lefebvre 1999, Bull 2003). Kolorektale Karzinome gehen zum Teil mit Mutationen von PPAR γ einher (Sarraf 1999). PPAR γ -Liganden wirken in HT-29- und anderen Tumorzellen anti-proliferativ und differenzierungsfördernd (Tontonoz 1997, Müller 1998, Brockman 1998, Sarraf 1998, Kitamura 1999). Ein synthetisierter PPAR γ -Antagonist inhibierte die Differenzierung von Adipozyten (Wright 2000). PPAR γ scheint also an der Regulation der Proliferation auch von Tumorzellen beteiligt zu sein.

In unseren Versuchen war in den unbehandelten Zelllinien HT-29 und SW-480 PPAR γ -Protein nur in geringster Menge nachweisbar. In SW-620-Zellen kam es nach 72-stündiger Inkubation mit dem Kontrollmedium zu einer nachweisbaren Expression von PPAR γ .

DuBois et al. untersuchten mittels Western Blot die Expression von PPAR γ in einer Reihe humaner Kolonkarzinomzelllinien; es fand sich teils eine deutliche Expression (CaCo-2, DLD-1), teils keine Expression von PPAR γ (SW-480, HCT-116) (DuBois 1998). Kitamura et al. dagegen wiesen in sechs untersuchten Kolonkarzinomzelllinien, darunter HT-29 und SW-480, PPAR γ -Protein nach (Kitamura 1999). Die Zellen waren hier jedoch über einen längeren Zeitraum bis zur Subkonfluenz inkubiert worden. Lefebvre et al. konnten zeigen, dass erst nach vermehrter Differenzierung von HT-29- und

CaCo-2-Zellen eine deutliche Expression von PPAR γ nachweisbar ist (Lefebvre 1999), wobei die längerfristige Inkubation der Zellen in Medium zu dieser vermehrten Differenzierung führen kann (Zweibaum 1985). Die unterschiedlichen Inkubationszeiten sowie die verschiedenen verwendeten Primärantikörper im Western Blot mit möglicherweise unterschiedlichen Nachweis-Sensitivitäten können die teils uneinheitlichen Beobachtungen hinsichtlich der PPAR γ -Expression in unbehandelten Kolonkarzinomzellen erklären.

Unsere Versuche zeigten nun, dass unter Butyrat-Inkubation die Expression von PPAR γ -Protein in den untersuchten Zelllinien induziert wird. Dieser Effekt geht mit der von unserer Arbeitsgruppe bereits früher gezeigten Zunahme der Differenzierung durch Butyrat einher. Dies geschieht in allen Zelllinien in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, indem eine längere Inkubation zu verstärkten Effekten führt. Für HT-29-Zellen lässt sich zudem eine Dosisabhängigkeit erkennen. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen an der humanen Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2, in denen die Inkubation mit Butyrat in einer zeit- und dosisabhängigen Induktion der PPAR γ -Expression resultiert. Als ein möglicher Mechanismus wird die Butyrat-vermittelte Hemmung des proteasomalen Abbaus von PPAR γ diskutiert. (Wächtershäuser 2000, 2002)

Die vermehrte Expression von PPAR γ stellt einen potentiellen Wirkmechanismus der Butyrat-Wirkung auf Kolonkarzinomzellen dar. Denkbar ist, dass durch die erhöhten intrazellulären PPAR γ -Spiegel die Wirkung physiologischer oder synthetischer PPAR γ -Liganden verstärkt wird. Wächtershäuser et al. konnten dies an CaCo-2-Zellen zeigen: Hier vermag der PPAR γ -Ligand Ciglitazone dosisabhängig die Butyrat-induzierte Differenzierung von CaCo-2-Zellen zu steigern (Wächtershäuser 2000). In Tiermodellen wirkten PPAR γ -Liganden auch protektiv bezüglich der Entstehung von Karzinomen an Prostata und Mamma (Elstner 1998, Kubota 1998, Suh 1999, Mehta 2000).

An APC^{Min}-Mäusen, die aufgrund einer Mutation im APC-Tumorsuppressorgen (*adenomatous polyposis coli*) anfällig für die Entstehung intestinaler Tumore sind, kam es jedoch unter Behandlung mit PPAR γ -Liganden zu einer vermehrten Bildung von Kolonpolyphen (Saez 1998, Lefebvre 1998). Die

Behandlung von Mäusen, denen humane Kolonkarzinomzellen transplantiert worden waren, mit PPAR γ -Liganden reduzierte das Tumorstadium wiederum signifikant; da hier sowohl Wildtyp-APC als auch mutiertes APC vorlagen, scheint die PPAR γ -Wirkung nicht vom APC-Status der Zellen abhängig zu sein (Sarraf 1998).

Eine Erklärung für die genannten Diskrepanzen könnte sein, dass PPAR γ umgebungsabhängig wirkt: wachstumshemmend in kultivierten Zellen und implantierten Tumoren, wachstumsfördernd dagegen im natürlichen Epithelzellverband (Seed 1998). Zudem scheint die Aktivität von PPAR γ abhängig zu sein vom Differenzierungsgrad der Zellen, der An- bzw. Abwesenheit von Kofaktoren, dem Vorliegen früher oder fortgeschrittener Tumorstadien und von möglichen genetischen Mutationen (Auwerx 2002, Na 2003, Thompson 2007). Auch werden Mutationen von PPAR γ für die teils fördernden, teils hemmenden Effekte auf die Tumorentstehung diskutiert (Girnun 2002).

Auch die Rolle der Cyclooxygenase (COX) verdeutlicht, dass die Effekte von PPAR γ auf die Tumorentstehung noch nicht umfassend verstanden sind. COX-Inhibitoren reduzieren bekanntermaßen das Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome. Einerseits können COX-Inhibitoren als PPAR γ -Liganden fungieren und somit auch über PPAR γ tumorprotektiv wirken. Andererseits werden verschiedene Fettsäuren unter anderem durch die COX-2 zu PPAR γ -Liganden metabolisiert; die COX-vermittelte Reduktion der Bildung PPAR γ -aktivierender Prostaglandine und Eicosanoide könnte so für einen vielmehr tumorfördernden Effekt von PPAR γ sprechen. (Rocchi 1999, Berger 2002)

Zu bedenken ist schließlich, dass der PPAR γ -Ligand Troglitazone in einem Modell PPAR γ -defizienter Embryonalzellen, also PPAR γ -unabhängig, anti-proliferativ wirkt, was möglicherweise mit den anti-oxidativen Eigenschaften dieses Thiazolidindiones in Zusammenhang steht (Palakurthi 2001). Effekte von PPAR γ -Liganden sind also nicht gleichzusetzen mit PPAR γ -vermittelten Effekten.

Es bedarf folglich weiterer Studien zum genaueren Verständnis der Wirkung von PPAR γ und seiner Liganden.

Dass Butyrat seine tumorprotektiven Effekte zumindest teilweise über PPAR γ ausübt, legt eine Vielzahl von Beobachtungen nahe, in denen PPAR γ -vermittelt die Apoptose bzw. ein Zellzyklusarrest induziert wird:

Die anti-proliferativen Effekte von Butyrat auf HT-29-Zellen sind mit einer verstärkten Expression des cdk-Inhibitors p21 verbunden, der einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase bewirkt (Siavoshian 1997). In humanen Kolonkarzinomzellen bewirken PPAR γ -Liganden ebenso einen Arrest der Zellen in der G₁-Phase (Brockman 1998). Die Expression von p21 bzw. p53 wurde in Pankreas- bzw. Nierenzellkarzinomzellen unter einem PPAR γ -Liganden gesteigert, es kam zu vermehrter Differenzierung bzw. Apoptose (Morrison 1999, Kawa 2002, Yang 2005). Die Aktivierung von PPAR γ induziert auch eine verminderte Expression von Cyclin D1 und PCNA, was wiederum in einem Zellzyklusarrest resultiert (Debril 2001, Yang 2005).

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ist ein wichtiger angiogenetischer Faktor, dessen Ausprägung unter anderem mit erhöhter Metastasierung und schlechter Prognose von Kolonkarzinomen assoziiert ist (Arii 1999). Auch unser Labor konnte zeigen, dass die Inkubation von HT-29-Zellen mit Butyrat zu einem Abfall von VEGF führt (Etzrodt 2001, Pellizzaro 2002). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass auch PPAR γ -Liganden die VEGF-induzierte Angiogenese inhibieren (Murata 2000).

Weitere Faktoren, über die sowohl Butyrat als auch PPAR γ -Liganden in Tumorzellen pro-apoptotisch oder proliferationshemmend wirken, sind die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. (Jiang 1998, Ricote 1998, Glinghammar 1999, Straus 2000, Lührs 2002)

Ob Butyrat tatsächlich über die genannten Mechanismen PPAR γ -vermittelt tumorprotektiv wirkt, bleibt zu klären.

Damit PPAR γ transkriptionell aktiv werden kann, benötigt es den Retinoid-X-Rezeptor alpha (**RXR α**) als Heterodimerisierungspartner. RXR α wird *in vivo* von

einer Vielzahl von Geweben exprimiert, so auch im Kolon (Dubuquoy 2002, Fan 2003). RXR α -mRNA bzw. -Protein wurde *in vitro* in verschiedenen humanen Kolonkarzinomzelllinien, darunter SW-480, HT-29 und CaCo-2, nachgewiesen (Xiao 2003, Kane 1996).

Unsere Versuche zeigen nun, dass alle drei untersuchten humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29, SW-480 und SW-620 in unbehandelter Form RXR α -Protein exprimieren. Es ist also prinzipiell möglich, dass Butyrat in diesen Zellen auch über eine gesteigerte Expression von PPAR γ anti-proliferativ wirkt; vermehrt gebildetes PPAR γ könnte mit RXR α heterodimerisieren und PPAR γ -Liganden könnten so vermehrt auf das Zellwachstum einwirken.

In vitro beeinflusst die kurzkettige Fettsäure Butyrat die Bildung verschiedener nukleärer Hormonrezeptoren: In Melanomzellen führt Butyrat zu einer vermehrten Bildung von RAR β (Demary 2001); in CaCo-2-Zellen induziert es die Expression des Vitamin-D-Rezeptors (Gaschott 2001). Die Omega-3-Fettsäure DHA steigerte in humanen Kolonkarzinomzellen *in vitro* die transkriptionale Aktivität von RXR α . In einem Rattenmodell führten Omega-3-Fettsäuren in den Kolonozyten zu einem Anstieg der RXR α -Expression gegenüber Omega-6-Fettsäuren. (Fan 2003). Dagegen verminderte DHA die Aktivität von PPAR β in Kolonkarzinomzellen (Lee 2002). In einem weiteren Rattenmodell führte eine fettreiche Ernährung zu einem Anstieg der Expression von PPAR γ , jedoch zu einem Abfall von RAR, während sich RXR α nicht signifikant änderte (Redonnet 2001).

Dies zeigt, dass Fettsäuren, wie in unseren Versuchen, unterschiedliche nukleäre Hormonrezeptoren in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Kameue et al. beobachteten in einem Kolonkarzinommodell an Ratten eine mit erhöhten Butyratspiegeln (nach Gluconatdiät) im Kolon einhergehende Reduktion von RAR α - und RXR γ -mRNA. Nach zusätzlicher Gabe eines Kanzerogens waren die mRNA-Spiegel in der Butyrat-Gruppe jedoch höher als in der Vergleichsgruppe (Kameue 2006). Der Einfluss von Butyrat auf die Bildung nukleärer Hormonrezeptoren scheint also auch abhängig vom jeweiligen genetischen Zustand der Zellen zu sein, wie ja auch Butyrat das Wachstum

normaler Epithelzellen stimuliert (Sakata 1987, Young 1995), während es in Karzinomzellen die Apoptose induziert (Hague 1995).

Die Bedeutung der nun in unseren Versuchen beobachteten dosis- und teils auch zeitabhängigen Reduktion der RXR α -Expression unter Inkubation mit Butyrat bei gleichzeitigem Anstieg der PPAR γ -Expression liegt möglicherweise in einem negativen Feedback-Mechanismus: Der Abfall von RXR α könnte so die PPAR γ -vermittelten anti-proliferativen Effekte von Butyrat in gewissen Grenzen halten und einer überschießenden Reaktion der Zelle auf Butyrat entgegenwirken (s. Schema 2). Es wurde in ähnlicher Weise beobachtet, dass die Aktivierung von PPAR γ durch Liganden zu einer Induktion des Ubiquitin-Proteasomen-Systems führt und in der Folge zur Degradation von PPAR γ (Blanquart 2003). Dieses System ist an der Regulation zahlreicher Proteine beteiligt, die an wesentlichen zellulären Funktionen wie der Zellzykluskontrolle, der Transkription sowie der Signaltransduktion beteiligt sind (Mimnaugh 1999). So wird die durch den Liganden aktivierte Modulation der Transkription in gewissen Bahnen selbstlimitiert. Auch RXR α wird durch das Ubiquitin-Proteasomen-System degradiert, wobei auch diese Degradation durch die Heterodimerisierung von RXR α moduliert wird (Kopf 2000). Die Induktion dieses Systems durch PPAR γ könnte die Degradation von RXR α begünstigen und so die Transkriptionsaktivität von PPAR γ kontrollieren. Vorstellbar ist, dass Butyrat eine vermehrte Bildung von PPAR γ bewirkt, wie dies unsere Versuche zeigen, und dass dieses vermehrt gebildete und mit RXR α heterodimerisierte PPAR γ die Degradation von RXR α induziert und so den von uns beobachteten Abfall von RXR α unter Butyrat bewirkt. Die Verringerung der mRNA-Stabilität sowie Förderung des Transports von RXR α aus dem Zellkern in das Zytoplasma, dem Ort seines Abbaus, sind weitere mögliche Mechanismen, die den Abfall der RXR α -Expression erklären können (Nomura 1999 [729, 388]).

Um den molekularen Mechanismus der Butyrat-Wirkung zu weiter einguzugrenzen, untersuchten wir zusätzlich den Effekt des Histondeacetylase-(HDAC-) Inhibitors Trichostatin A (TSA) auf die Expression der nukleären

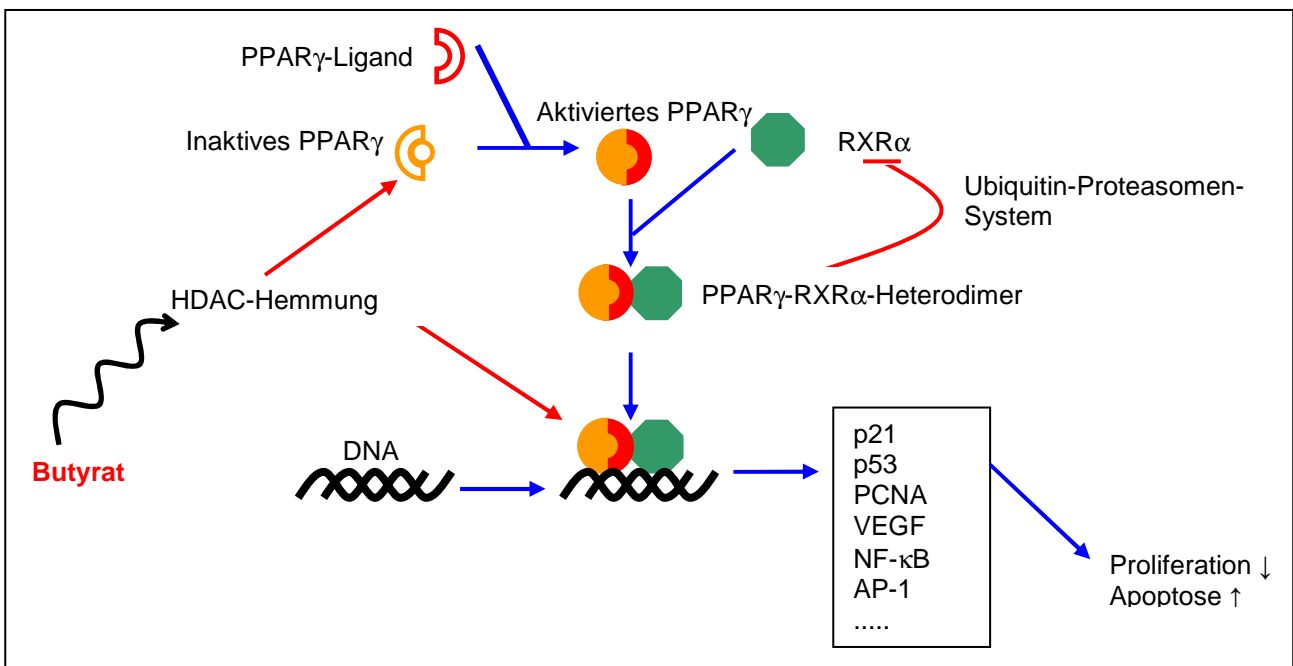
Hormonrezeptoren PPAR γ und RXR α . Neben einer Inhibition der Zellproliferation der humanen Kolonkarzinomzelllinien kam es unter TSA auch zur vermehrten Bildung von PPAR γ . Butyrat könnte also über die Inhibition der HDAC die Expression von PPAR γ induzieren und so proliferationshemmend wirken. Ebenso hatte TSA in unseren Versuchen dieselben supprimierenden Effekte auf die Expression von RXR α wie Butyrat. So könnte die Inhibierung der RXR α -Expression durch Butyrat auch auf eine Hemmung der HDAC zurückzuführen sein.

In Abwesenheit aktivierender Liganden bilden nukleäre Hormonrezeptoren wie PPAR γ und RXR α durch Rekrutierung einer HDAC Komplexe mit Korepressoren, wodurch letztlich die Aktivierung der entsprechenden Zielgene der DNA supprimiert wird. Nach Bindung eines Liganden dissoziiert der Korepressor und durch Komplexbildung mit einem Koaktivator wird eine Histonacetyltransferase (HAT) rekrutiert, was über eine vermehrte Acetylierung der DNA zu gesteigerter transkriptioneller Aktivität an den jeweiligen Zielgenen führt. (Cho 1997, Gelman 1999) Dabei konkurrieren verschiedene nukleäre Hormonrezeptoren sowie eine Reihe von Nicht-Rezeptor-Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B um diese Koaktivatoren (Chakravarti 1996, Kodera 2000). Butyrat könnte also zum einen durch eine HDAC-vermittelte Steigerung der PPAR γ -Expression die Aktivität tumorprotektiver PPAR γ -Zielgene induzieren. Zum anderen könnte Butyrat durch Hemmung der HDAC zu einer vermehrten Aktivierung von PPAR γ führen, unabhängig von der Bindung aktivierender PPAR γ -Liganden.

Daneben werden auch direkte physikalische Interaktionen zwischen nukleären Hormonrezeptoren wie PPAR γ und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder dem anti-apoptotisch wirkenden NF- κ B beobachtet. Für diese direkten Interaktionen bedarf es dabei möglicherweise keiner vorhergehenden Heterodimerisierung von PPAR γ mit RXR α (Thompson 2007). Die Aktivität eines RXR α -NF- κ B-Komplexes könnte daneben durch Butyrat vermindert werden und Butyrat auf diese Weise tumorprotektiv wirken (Na 1999).

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob Butyrat auf eine der genannten Weisen *in vivo* eine Rolle in der Karzinogenese spielt. Von großer Bedeutung wird hierbei sein, Näheres über die Natur und Wirkungsweise von Liganden von PPAR γ und RXR α zu erfahren.

Enttäuschend in Hinblick auf eine mögliche Tumorprävention durch PPAR γ -Liganden wie die Thiazolidindione ist, dass bisher bei der Vielzahl so behandelter Typ-2-Diabetiker auch nach Langzeittherapie kein signifikanter Abfall der Kolonkarzinominzidenz beobachtet werden konnte; zudem spricht das Auftreten vermehrter kardiovaskulärer und hepatotoxischer Nebenwirkungen gegen eine solche Langzeittherapie.



Schema 2: Möglicher anti-proliferativer Wirkmechanismus von Butyrat in humanen Kolonkarzinomzellen: Über eine Hemmung der HDAC wird die Bildung von PPAR γ induziert, welches wiederum über verschiedene Mechanismen die Proliferation modifiziert. Vermehrte PPAR γ -Expression führt dabei zu verminderter Expression von RXR α im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Epidemiologische Studien zeigen, dass eine obst-, gemüse- und ballstoffreiche Ernährung mit einer verminderten Inzidenz des kolorektalen Karzinoms verbunden ist. Von den vielen Komponenten einer solchen Ernährung wurde insbesondere für die Gruppe der Carotinoide wie β -Carotin und Lycopin eine tumorprotektive Wirkung beschrieben. Es gibt eine Vielzahl von möglichen Mechanismen für diese Schutzwirkung: Carotinoide sind potente Antioxidantien, und oxidativer Stress ist ein etablierter Faktor in der Karzinogenese. Auch können viele Carotinoide zu Retinoiden umgewandelt werden, die bekannte anti-karzerogene Eigenschaften besitzen.

Um zu untersuchen, ob Carotinoide tumorprotektive Eigenschaften durch eine Beeinflussung der Zellzyklusprogression ausüben, wurden in dieser Arbeit die möglichen Effekte von β -Carotin und Lycopin auf die Proliferation von humanen Kolonkarzinomzelllinien und die Expression der an der Zellzyklusregulation beteiligten Proteine cdk2, p53 und PCNA sowie der Cdk-Inhibitoren p21^{waf1/cip1} und p27^{kip1} untersucht. Hierzu dienten die humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und SW-620 als *in vitro*-Modell. Im Western Blot wurde anschließend die Expression der entsprechenden Proteine bestimmt.

Die Inkubation der Zellen mit Lycopin und β -Carotin führte zu verminderter Proliferation der untersuchten Zelllinien. Dies steht in Einklang zu anderen Untersuchungen, die anti-proliferative Effekte von β -Carotin und Lycopin zeigten.

Es ließen sich jedoch keine Effekte auf die Expression der untersuchten, an der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteine nachweisen. Es ergibt sich somit aus dieser Arbeit kein Anhalt dafür, dass die proliferationshemmenden Effekte dieser Carotinoide durch eine Modulation der Progression im Zellzyklus vermittelt werden. Vielmehr scheinen andere Mechanismen eine Rolle zu spielen. Weitere Untersuchungen wären nötig, z.B. mittels Transcriptom- und Proteom-Analytik, um die hier ursächlichen genetischen Veränderungen zu identifizieren.

Ein weiterer beschriebener Mechanismus der Proliferationshemmung in Kolonkarzinomzellen ist die Aktivierung von PPAR γ . PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) ist ein nukleärer Hormonrezeptor, der durch Liganden wie Prostaglandin D₂, mehrfach ungesättigte Fettsäuren sowie Zyklooxygenase-Inhibitoren und Thiazolidindione aktiviert wird.

Butyrat, das bei der bakteriellen Fermentation unverdauter Kohlenhydrate im Kolon entsteht, ist ein weiterer Ernährungsfaktor, der positiv mit einer erniedrigten kolorektalen Tumorinzidenz korreliert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die anti-proliferativen *in vitro*-Wirkungen der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auf Kolonkarzinomzellen mit einer Modulation der Expression von PPAR γ einhergehen.

Butyrat führte in dieser Arbeit zu einer Proliferationshemmung der Kolonkarzinomzelllinien HT-29, SW-480 und SW-620. Darüber hinaus induzierte es in allen drei untersuchten Zelllinien die Expression von PPAR γ -Protein, welches in unbehandelten Zellen nur minimal nachweisbar war. Sollten Wirkungen von Butyrat zumindest teilweise über PPAR γ vermittelt werden, so müsste auch dessen Heterodimerisierungspartner RXR α (*retinoid X receptor alpha*) in den Zellen vorhanden sein. Es zeigte sich, dass alle drei Zelllinien unbehandelt RXR α exprimieren. Unter Butyrat-Inkubation verringerte sich interessanterweise die Expression von RXR α -Protein. Diese Ergebnisse lassen sich möglicherweise als negativer Feedback-Mechanismus erklären, um einen überschießenden Effekt von PPAR γ oder seiner Liganden zu verhindern. Die untersuchten Carotinoide hatten dagegen keinen Effekt auf die Expression von PPAR γ .

Zur Untersuchung des molekularen Wirkmechanismus von Butyrat diente Trichostatin A (TSA), welches die Histondeacetylase (HDAC) hemmt, die DNA so zugänglicher für Transkriptionsfaktoren macht und dadurch die Expression verschiedener Proteine moduliert. TSA inhibierte in gleicher Weise wie Butyrat die Proliferation der Zellen, induzierte die Expression von PPAR γ und supprimierte die Expression von RXR α . Es ist also eine HDAC-Inhibition als Wirkweg der Butyrat-Wirkung auf die Zellen am wahrscheinlichsten, wodurch vermehrt PPAR γ gebildet wird. Denkbar ist, dass durch die so erhöhten

intrazellulären PPAR γ -Spiegel die tumorprotektive Wirkung physiologischer oder synthetischer Liganden verstärkt wird. Eine Kombinationstherapie aus Butyrat und PPAR γ -Liganden zur Tumorprotektion ist so prinzipiell denkbar. Zukünftige Untersuchungen müssen das Augenmerk insbesondere auch auf die Klärung der umgebungsabhängigen PPAR γ -Wirkung richten, um die teils diskrepanten Befunde an Tumorzellkulturen und Tiermodellen einerseits, im natürlichen Epithelzellverband andererseits zu klären.

Immer mehr setzt sich die Erkenntnis durch, dass sich nicht ein Stoff alleine als tumorprotektives „Allheilmittel“ herausstellen wird, sondern dass eine Kombination von Ernährungsfaktoren zusammen mit einem auch sonst „gesunden“ Lebensstil letztlich am vielversprechendsten in der Prophylaxe auch von Tumorerkrankungen ist.

Fachgesellschaften wie die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) tragen dem Rechnung. So empfiehlt die DGE: „Getreideprodukte - mehrmals am Tag“, „Gemüse und Obst - Nimm "5" am Tag“ sowie „Bleiben Sie in Bewegung“ (DGE 2000).

6. Literaturverzeichnis

1. Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B. & Stark, G. R. The p53 network. *J Biol Chem* **273**, 1-4. (1998).
2. Alabaster, O., Tang, Z., Frost, A. & Shivapurkar, N. Effect of beta-carotene and wheat bran fiber on colonic aberrant crypt and tumor formation in rats exposed to azoxymethane and high dietary fat. *Carcinogenesis* **16**, 127-32. (1995).
3. Alberts, D. S. et al. Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N Engl J Med* **342**, 1156-62. (2000).
4. Amir, H. et al. Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr Cancer* **33**, 105-12. (1999).
5. Arber, N. et al. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* **110**, 669-74. (1996).
6. Archer, S. Y., Meng, S., Shei, A. & Hodin, R. A. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6791-6. (1998).
7. Arij, S. et al. Implication of vascular endothelial growth factor in the development and metastasis of human cancers. *Hum Cell* **12**, 25-30. (1999).
8. Auboeuf, D. et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**, 1319-27. (1997).
9. Auwerx, J. Nuclear receptors. I. PPAR gamma in the gastrointestinal tract: gain or pain? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G581-5. (2002).
10. Barak, Y. et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* **4**, 585-95. (1999).
11. Barnard, J. A. & Warwick, G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ* **4**, 495-501 (1993).
12. Basson, M. D., Turowski, G. A., Rashid, Z., Hong, F. & Madri, J. A. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig Dis Sci* **41**, 1989-93 (1996).
13. Beg, A.A. & Baltimore, D. An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* **274**, 782-4 (1996).
14. Benito, E. et al. A population-based case-control study of colorectal cancer in Majorca. I. Dietary factors. *Int J Cancer* **45**, 69-76. (1990).
15. Berger, J. & Moller, D. E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* **53**, 409-35. (2002).
16. Bertram, J. S., Kolonel, L. N. & Meyskens, F. L., Jr. Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. *Cancer Res* **47**, 3012-31. (1987).
17. Bertram, J. S. et al. Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation. *Carcinogenesis* **12**, 671-8. (1991).
18. Bertram, J. S. & Bortkiewicz, H. Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. *Am J Clin Nutr* **62**, 1327S-1336S. (1995).

19. Bingham, S. A. et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* **361**, 1496-501. (2003).
20. Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J. C., Staels, B. & Glineur, C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 267-73. (2003).
21. Block, G., Patterson, B. & Subar, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* **18**, 1-29. (1992).
22. Bonithon-Kopp, C., Kronborg, O., Giacosa, A., Rath, U. & Faivre, J. Calcium and fibre supplementation in prevention of colorectal adenoma recurrence: a randomised intervention trial. European Cancer Prevention Organisation Study Group. *Lancet* **356**, 1300-6. (2000).
23. Briviba, K., Schnabele, K., Schwertle, E., Blockhaus, M. & Rechkemmer, G. Beta-carotene inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro by induction of apoptosis. *Biol Chem* **382**, 1663-8. (2001).
24. Brockman, J. A., Gupta, R. A. & Dubois, R. N. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells [see comments]. *Gastroenterology* **115**, 1049-55 (1998).
25. Bruce, W. R. Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Res* **47**, 4237-42 (1987).
26. Bull, A. W. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colon cancer and inflammatory bowel disease. *Arch Pathol Lab Med* **127**, 1121-3. (2003).
27. Burkitt, D. P. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* **28**, 3-13. (1971).
28. Burton, G. W. & Ingold, K. U. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**, 569-73. (1984).
29. Caderni, G. et al. Dietary determinants of colorectal proliferation in the normal mucosa of subjects with previous colon adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 219-25. (1999).
30. Cayrol, C., Knibiehler, M. & Ducommun, B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* **16**, 311-20. (1998).
31. Cesarini, J. P., Michel, L., Maurette, J. M., Adhoute, H. & Bejot, M. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **19**, 182-9. (2003).
32. Chai, F., Evdokiou, A., Young, G. P. & Zalewski, P. D. Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis* **21**, 7-14 (2000).
33. Chakravarti, D. et al. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling [see comments]. *Nature* **383**, 99-103 (1996).
34. Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* **10**, 940-54 (1996).
35. Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D. & Lazar, M. A. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant

- expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798-800 (1994).
36. Cho, Y., Tighe, A.P. & Talmage, D.A. Retinoic acid induced growth arrest of human breast carcinoma cells requires protein kinase C alpha expression and activity. *J Cell Physiol* **172**, 306-13. (1997).
 37. Chug-Ahuja, J. K. et al. The development and application of a carotenoid database for fruits, vegetables, and selected multicomponent foods. *J Am Diet Assoc* **93**, 318-23. (1993).
 38. Chung, D. C. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* **119**, 854-65. (2000).
 39. Clarke, S. D., Thuillier, P., Baillie, R. A. & Sha, X. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Am J Clin Nutr* **70**, 566-71 (1999).
 40. Clinton, S. K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev* **56**, 35-51. (1998).
 41. Colditz, G. A. et al. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *Am J Clin Nutr* **41**, 32-6. (1985).
 42. Collins, A. R., Olmedilla, B., Southon, S., Granado, F. & Duthie, S. J. Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* **19**, 2159-62. (1998).
 43. Cousens, L. S., Gallwitz, D. & Alberts, B. M. Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *J Biol Chem* **254**, 1716-23 (1979).
 44. Crew, T. E., Elder, D. J. & Paraskeva, C. 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* **21**, 69-77 (2000).
 45. Csordas, A. On the biological role of histone acetylation. *Biochem J* **265**, 23-38 (1990).
 46. Cummings, J. H. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* **22**, 763-79 (1981).
 47. Debril, M. B., Renaud, J. P., Fajas, L. & Auwerx, J. The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Med* **79**, 30-47. (2001).
 48. Decensi, A. & Costa, A. Recent advances in cancer chemoprevention, with emphasis on breast and colorectal cancer. *Eur J Cancer* **36**, 694-709. (2000).
 49. Demary, K., Wong, L. & Spanjaard, R. A. Effects of retinoic acid and sodium butyrate on gene expression, histone acetylation and inhibition of proliferation of melanoma cells. *Cancer Lett* **163**, 103-7. (2001).
 50. Desreumaux, P. et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* **193**, 827-38. (2001).
 51. Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Empfehlung der DGE „Vollwertig Essen und Trinken nach den 10 Regeln der DGE“. 2000.

52. Di Mascio, P., Kaiser, S. & Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* **274**, 532-8. (1989).
53. Dragnev, K. H., Rigas, J. R. & Dmitrovsky, E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist* **5**, 361-8. (2000).
54. DuBois, R. N. et al. The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis* **19**, 49-53 (1998).
55. Dubuquoy, L. et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet* **360**, 1410-8. (2002).
56. Dyson, E. et al. Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha -/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7386-90 (1995).
57. el-Deiry, W. S. et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**, 1169-74. (1994).
58. Ellis, R. E., Yuan, J. Y. & Horvitz, H. R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 663-98. (1991).
59. Elson, C. E., Peffley, D. M., Hentosh, P. & Mo, H. Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: potential application to cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* **221**, 294-311. (1999).
60. Elstner, E. et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8806-11. (1998).
61. Etzrodt, G., Lührs, H., Kreth, F., Kelber, E., Melcher, R., Scheppach, W. & Menzel, T. Butyrat senkt die Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in kolorektalen Karzinomzellen. Abstraktband der 2. Bad Brückenauer Wintertagung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg:11. (2001).
62. Fajas, L. et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* **272**, 18779-89 (1997)..
63. Fan, Y. Y., Spencer, T. E., Wang, N., Moyer, M. P. & Chapkin, R. S. Chemopreventive n-3 fatty acids activate RXRalpha in colonocytes. *Carcinogenesis* **24**, 1541-8. (2003).
64. Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**,759-67. (1990).
65. Fogh, J. Human tumor cells in vitro. New York, Plenum Press: 115-59. (1975).
66. Forman, B. M. et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-12. (1995).
67. Forssberg, A., Lingen, C., Ernster, L. & Lindberg, O. Modification of the x-irradiation syndrome by lycopene. *Exp Cell Res* **16**, 7-14. (1959).
68. Franceschi, S. et al. Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *Int J Cancer* **59**, 181-4. (1994).
69. Frommel, T. O. et al. Effect of beta-carotene supplementation on indices of colonic cell proliferation. *J Natl Cancer Inst* **87**, 1781-7. (1995).
70. Fuchs, C. S. et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* **340**, 169-76. (1999).

71. Fuhrman, B., Elis, A. & Aviram, M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **233**, 658-62. (1997).
72. Gamet, L., Daviaud, D., Denis-Pouxviel, C., Remesy, C. & Murat, J. C. Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Cancer* **52**, 286-9 (1992).
73. Gann, P. H. et al. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* **59**, 1225-30. (1999).
74. Garewal, H. S. et al. Response of oral leukoplakia to beta-carotene. *J Clin Oncol* **8**, 1715-20. (1990).
75. Gaschott, T., Werz, O., Steinmeyer, A., Steinhilber, D. & Stein, J. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is mediated by vitamin D receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 690-6. (2001).
76. Gelman, L., Fruchart, J. C. & Auwerx, J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci* **55**, 932-43. (1999).
77. Gerhold, D. L., Liu, F., Jiang, G. et al. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology* **143**, 2106-18. (2002).
78. Gerster, H. Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res* **63**, 93-121. (1993).
79. Gerster, H. Beta-carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. *Eur J Clin Nutr* **49**, 155-68. (1995).
80. Gerster, H. The potential role of lycopene for human health. *J Am Coll Nutr* **16**, 109-26. (1997).
81. Giardina, C., Boulares, H. & Inan, M. S. 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* **1448**, 425-38. (1999).
82. Gibson, P. R. The intracellular target of butyrate's actions: HDAC or HDON'T? [comment]. *Gut* **46**, 447-8 (2000).
83. Giovannucci, E. & Willett, W. C. Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* **26**, 443-52. (1994).
84. Giovannucci, E. et al. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **87**, 1767-76. (1995).
85. Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* **91**, 317-31. (1999).
86. Girnun, G. D. et al. APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13771-6. (2002).
87. Glinghammar, B., Holmberg, K. & Rafter, J. Effects of colonic luminal components on AP-1-dependent gene transcription in cultured human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* **20**, 969-76. (1999).
88. Goldin, B. R. & Gorbach, S. L. The relationship between diet and rat fecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* **57**, 371-5 (1976).

89. Gottlicher, M., Heck, S. & Herrlich, P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action [see comments]. *J Mol Med* **76**, 480-9 (1998).
90. Granville, D.J. & Carthy, C.M. et al. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* **78**, 893-913. (1998).
91. Greenberg, E. R. et al. A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med* **331**, 141-7. (1994).
92. Gupta, R. A. et al. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13275-80. (2000).
93. 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* **55**, 498-505 (1993).
94. Hague, A. & Paraskeva, C. The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *Eur J Cancer Prev* **4**, 359-64 (1995).
95. Harper, J. W. et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* **6**, 387-400. (1995).
96. Harris, P. J. & Ferguson, L. R. Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutat Res* **290**, 97-110 (1993).
97. Hazuka, M. B., Edwards-Prasad, J., Newman, F., Kinzie, J. J. & Prasad, K. N. Beta-carotene induces morphological differentiation and decreases adenylate cyclase activity in melanoma cells in culture. *J Am Coll Nutr* **9**, 143-9. (1990).
98. Heber, D. & Lu, Q. Y. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 920-3. (2002).
99. Heerdt, B. G., Houston, M. A. & Augenlicht, L. H. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* **54**, 3288-93 (1994).
100. Hennekens, C. H. et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **334**, 1145-9. (1996).
101. Iftikhar, S., Lietz, H., Mobarhan, S. & Frommel, T. O. In vitro beta-carotene toxicity for human colon cancer cells. *Nutr Cancer* **25**, 221-30. (1996).
102. Ilyas, M., Tomlinson I.P.M., Rowan, A., Pignatelli, M., Bodmer, W.F. beta-Catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10330-4 (1997).
103. Inan, M. S. et al. The Luminal Short-Chain Fatty Acid Butyrate Modulates NF-kappaB Activity in a Human Colonic Epithelial Cell Line. *Gastroenterology* **118**, 724-734 (2000).
104. Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators [see comments]. *Nature* **347**, 645-50 (1990).
105. Jiang, C., Ting, A. T. & Seed, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**, 82-6 (1998).

106. Kameue, C., Tsukahara, T. & Ushida, K. Alteration of gene expression in the colon of colorectal cancer model rat by dietary sodium gluconate. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 606-14. (2006).
107. Kane, K. F., Langman, M. J. & Williams, G. R. Antiproliferative responses to two human colon cancer cell lines to vitamin D3 are differently modified by 9-cis-retinoic acid. *Cancer Res* **56**, 623-32. (1996).
108. Karas, M. et al. Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr Cancer* **36**, 101-11. (2000).
109. Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-6 (1997).
110. Kawa, S. et al. Growth inhibition and differentiation of pancreatic cancer cell lines by PPAR gamma ligand troglitazone. *Pancreas* **24**, 1-7. (2002).
111. Kazi, N. et al. Immunomodulatory effect of beta-carotene on T lymphocyte subsets in patients with resected colonic polyps and cancer. *Nutr Cancer* **28**, 140-5. (1997).
112. Kennedy, T. A. & Liebler, D. C. Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *J Biol Chem* **267**, 4658-63. (1992).
113. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57. (1972).
114. Kim, D. J. et al. Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. *Cancer Lett* **120**, 15-22. (1997).
115. Kim, J. M. et al. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis* **19**, 81-5. (1998).
116. Kim, Y. I. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* **118**, 1235-57. (2000).
117. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-70 (1996).
118. Kitamura, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **90**, 75-80 (1999).
119. Kliewer, S. A. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4318-23 (1997).
120. Kodera, Y. et al. Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J Biol Chem* **275**, 33201-4. (2000).
121. Kopf, E. et al. Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **275**, 33280-8. (2000).
122. Krinsky, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* **7**, 617-35. (1989).

123. Kubota, T. et al. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* **58**, 3344-52. (1998).
124. Kuo, M. H. & Allis, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615-26 (1998).
125. Lai, B. T. [Effects of beta-carotene on lung cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **15**, 351-4. (1993). [Abstract].
126. Lee, J. Y. & Hwang, D. H. Docosahexaenoic acid suppresses the activity of peroxisome proliferator-activated receptors in a colon tumor cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 667-74. (2002).
127. Lefebvre, A. M. et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med* **4**, 1053-7 (1998).
128. Lefebvre, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* **162**, 331-40 (1999).
129. Lehmann, J. M. et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* **270**, 12953-6 (1995).
130. Lehmann, J. M., Lenhard, J. M., Oliver, B. B., Ringold, G. M. & Kliewer, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* **272**, 3406-10 (1997).
131. Leibovitz, A. et al. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* **36**, 4562-9 (1976).
132. Levy, J. et al. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr Cancer* **24**, 257-66. (1995).
133. Li, Z., Wang, Y. & Mo, B. [The effects of carotenoids on the proliferation of human breast cancer cell and gene expression of bcl-2]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **36**, 254-7. (2002). [Abstract].
134. Liebler, D. C. & McClure, T. D. Antioxidant reactions of beta-carotene: identification of carotenoid-radical adducts. *Chem Res Toxicol* **9**, 8-11. (1996).
135. Lippman, S. M. & Lotan, R. Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. *J Nutr* **130**, 479S-482S (2000).
136. Liu, C. et al. Effects of physiological versus pharmacological beta-carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette smoke-exposed ferrets. *Carcinogenesis* **21**, 2245-53. (2000).
137. Liu, C., Lian, F., Smith, D. E., Russell, R. M. & Wang, X. D. Lycopene supplementation inhibits lung squamous metaplasia and induces apoptosis via up-regulating insulin-like growth factor-binding protein 3 in cigarette smoke-exposed ferrets. *Cancer Res* **63**, 3138-44. (2003).
138. Lotan, R. Lung cancer promotion by beta-carotene and tobacco smoke: relationship to suppression of retinoic acid receptor-beta and increased activator protein-1? *J Natl Cancer Inst* **91**, 7-9. (1999).

139. Lowe, G. M., Booth, L. A., Young, A. J. & Bilton, R. F. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radic Res* **30**, 141-51. (1999).
140. Lührs, H. et al. Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB. *Anticancer Res* **22**, 1561-8. (2002).
141. Mansen, A., Guardiola-Diaz, H., Rafter, J., Branting, C. & Gustafsson, J. A. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* **222**, 844-51 (1996).
142. McIntyre, A., Young, G. P., Taranto, T., Gibson, P. R. & Ward, P. B. Different fibers have different regional effects on luminal contents of rat colon. *Gastroenterology* **101**, 1274-81 (1991).
143. McIntyre, A., Gibson, P. R. & Young, G. P. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* **34**, 386-91 (1993).
144. Mehta, R. G., Williamson, E., Patel, M. K. & Koeffler, H. P. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer Inst* **92**, 418-23 (2000).
145. Melcher, R., Koehler, S., Steinlein, C., Schmid, M., Mueller, C.R., Luehrs, H., Menzel, T., Scheppach, W., Moerk, H., Scheurlen, M., Koehrlé, J. & Al-Taie, O. Spectral karyotype analysis of colon cancer cell lines of the tumor suppressor and mutator pathway. *Cytogenet Genome Res* **98**, 22-8. (2002).
146. Meyskens, F. L., Jr. & Manetta, A. Prevention of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Am J Clin Nutr* **62**, 1417S-1419S. (1995).
147. Michalovitz, D., Halevy, O. & Oren, M. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* **62**, 671-80. (1990).
148. Mimnaugh, E. G., Bonvini, P. & Neckers, L. The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins. *Electrophoresis* **20**, 418-28. (1999).
149. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-4. (1995).
150. Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-91. (1997).
151. Morrison, R. F. & Farmer, S. R. Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem* **274**, 17088-97 (1999).
152. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **360**, 23-33. (2002).
153. Müller, E. et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* **1**, 465-70 (1998).
154. Müller, E. et al. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10990-5. (2000).
155. Muir, K.R. & Logan, R.F.A. Aspirin, NSAIDs and colorectal cancer- what do the epidemiological studies show and what do they tell us about the modus operandi? *Apoptosis* **4**, 389-96. (1999).

156. Murata, T. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 2309-17. (2000).
157. Na, H. K. & Surh, Y. J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochem Pharmacol* **66**, 1381-91. (2003).
158. Na, S. Y. et al. Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkappaB. *J Biol Chem* **274**, 7674-80 (1999).
159. Nagasawa, H., Mitamura, T., Sakamoto, S. & Yamamoto, K. Effects of lycopene on spontaneous mammary tumour development in SHN virgin mice. *Anticancer Res* **15**, 1173-8. (1995).
160. Nahum, A. et al. Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene* **20**, 3428-36. (2001).
161. Narisawa, T. et al. Inhibitory effects of natural carotenoids, alpha-carotene, beta-carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. *Cancer Lett* **107**, 137-42. (1996).
162. Narisawa, T. et al. Prevention of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats by lycopene and tomato juice rich in lycopene. *Jpn J Cancer Res* **89**, 1003-8. (1998).
163. Nierenberg, D. W., Stukel, T. A., Baron, J. A., Dain, B. J. & Greenberg, E. R. Determinants of increase in plasma concentration of beta-carotene after chronic oral supplementation. The Skin Cancer Prevention Study Group. *Am J Clin Nutr* **53**, 1443-9. (1991).
164. Nomura, Y., Nagaya, T., Hayashi, Y., Kambe, F. & Seo, H. 9-cis-retinoic acid decreases the level of its cognate receptor, retinoid X receptor, through acceleration of the turnover. *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 729-33 (1999).
165. Nomura, Y., Nagaya, T., Yamaguchi, S., Katunuma, N. & Seo, H. Cleavage of RXRalpha by a lysosomal enzyme, cathepsin L-type protease. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 388-94 (1999).
166. Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P. & Bradbury, E. M. Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* **57**, 449-57 (1989).
167. Okai, Y. & Higashi-Okai, K. Possible immunomodulating activities of carotenoids in in vitro cell culture experiments. *Int J Immunopharmacol* **18**, 753-8. (1996).
168. Olmedilla, B., Granado, F., Gil-Martinez, E., Blanco, I. & Rojas-Hidalgo, E. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem* **43**, 1066-71. (1997).
169. Olson, J. A. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *J Nutr* **119**, 105-8. (1989).
170. Omenn, G. S. et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst* **88**, 1550-9. (1996).

171. Onogi, N. et al. Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. *Nutr Cancer* **32**, 20-4. (1998).
172. Palakurthi, S. S., Aktas, H., Grubissich, L. M., Mortensen, R. M. & Halperin, J. A. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* **61**, 6213-8. (2001).
173. Palmer, D. G., Paraskeva, C. & Williams, A. C. Modulation of p53 expression in cultured colonic adenoma cell lines by the naturally occurring luminal factors butyrate and deoxycholate. *Int J Cancer* **73**, 702-6. (1997).
174. Palozza, P. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by beta-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. *Carcinogenesis* **23**, 11-8. (2002).
175. Palozza, P. et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by beta-carotene in undifferentiated and differentiated HL-60 leukemia cells: possible involvement of a redox mechanism. *Int J Cancer* **97**, 593-600. (2002).
176. Palozza, P. et al. Beta-carotene regulates NF-kappaB DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. *J Nutr* **133**, 381-8. (2003).
177. Pappalardo, G. et al. Plasma (carotenoids, retinol, alpha-tocopherol) and tissue (carotenoids) levels after supplementation with beta-carotene in subjects with precancerous and cancerous lesions of sigmoid colon. *Eur J Clin Nutr* **51**, 661-6. (1997).
178. Parker, R. S. Carotenoids in human blood and tissues. *J Nutr* **119**, 101-4. (1989).
179. Pastori, M., Pfander, H., Boscoboinik, D. & Azzi, A. Lycopene in association with alpha-tocopherol inhibits at physiological concentrations proliferation of prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 582-5. (1998).
180. Pellizzaro, C., Coradini, D. & Daidone, M. G. Modulation of angiogenesis-related proteins synthesis by sodium butyrate in colon cancer cell line HT29. *Carcinogenesis* **23**, 735-40. (2002).
181. Peters, U. et al. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* **361**, 1491-5. (2003).
182. Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D. & Sporn, M. B. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* **290**, 201-8. (1981).
183. Planas-Silva, M. D. & Weinberg, R. A. Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Biol* **17**, 4059-69. (1997).
184. Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Müller, H., Wollowski, I. & Rechkemmer, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* **18**, 1847-50. (1997).
185. Potter, J. D., Slattery, M. L., Bostick, R. M. & Gapstur, S. M. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* **15**, 499-545 (1993).
186. Rao, A. V. & Agarwal, S. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr Cancer* **31**, 199-203. (1998).

187. Redonnet, A. et al. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. *Metabolism* **50**, 1161-7. (2001).
188. Ribeiro, R. C., Kushner, P. J. & Baxter, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med* **46**, 443-53 (1995).
189. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79-82 (1998).
190. Riggs, M. G., Whittaker, R. G., Neumann, J. R. & Ingram, V. M. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* **268**, 462-4 (1977).
191. Riso, P. & Porrini, M. Determination of carotenoids in vegetable foods and plasma. *Int J Vitam Nutr Res* **67**, 47-54. (1997).
192. Riso, P., Pinder, A., Santangelo, A. & Porrini, M. Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am J Clin Nutr* **69**, 712-8. (1999).
193. Robertson, A. M., Ferguson, L. R., Hollands, H. J. & Harris, P. J. Adsorption of a hydrophobic mutagen to five contrasting dietary fiber preparations. *Mutat Res* **262**, 195-202 (1991).
194. Rocchi, S. & Auwerx, J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann Med* **31**, 342-51 (1999).
195. Roediger, W. E. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Cancer Res* **42**, 4540-5 (1982).
196. 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* **6**, 729-35 (1999).
197. Saez, E. et al. Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med* **4**, 1058-61 (1998).
198. Sakata, T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br J Nutr* **58**, 95-103. (1987).
199. Sandler, R. S. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **25**, 717-35 (1996).
200. Sarraf, P. et al. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma [see comments]. *Nat Med* **4**, 1046-52 (1998).
201. Sarraf, P. et al. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell* **3**, 799-804. (1999).
202. Schatzkin, A. et al. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med* **342**, 1149-55. (2000).
203. Scheinman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A. & Baldwin, A. S., Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* **15**, 943-53 (1995).
204. Scheppach, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* **35**, S35-8 (1994).

205. Scheppach, W., Bartram, H. P. & Richter, F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer* **31A**, 1077-80 (1995).
206. Schoonjans, K., Martin, G., Staels, B. & Auwerx, J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* **8**, 159-66 (1997).
207. Schwartz, J. L., Antoniades, D. Z. & Zhao, S. Molecular and biochemical reprogramming of oncogenesis through the activity of prooxidants and antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* **686**, 262-78; discussion 278-9. (1993).
208. Sealy, L. & Chalkley, R. The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* **14**, 115-21. (1978).
209. Seed, B. PPARgamma and colorectal carcinoma: conflicts in a nuclear family [news; comment]. *Nat Med* **4**, 1004-5 (1998).
210. Sen, C. K. & Packer, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* **10**, 709-20. (1996).
211. Sgambato, A., Cittadini, A., Faraglia, B. & Weinstein, I. B. Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* **183**, 18-27. (2000).
212. Sharoni, Y., Giron, E., Rise, M. & Levy, J. Effects of lycopene-enriched tomato oleoresin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *Cancer Detect Prev* **21**, 118-23. (1997).
213. Sharoni, Y. et al. Modulation of transcriptional activity by antioxidant carotenoids. *Mol Aspects Med* **24**, 371-84. (2003).
214. Sherr, C. J. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* **20**, 187-90. (1995).
215. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12. (1999).
216. Shivapurkar, N., Tang, Z., Frost, A. & Alabaster, O. Inhibition of progression of aberrant crypt foci and colon tumor development by vitamin E and beta-carotene in rats on a high-risk diet. *Cancer Lett* **91**, 125-32. (1995).
217. Shultz, T. D., Chew, B. P., Seaman, W. R. & Luedecke, L. O. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene on the in vitro growth of human cancer cells. *Cancer Lett* **63**, 125-33. (1992).
218. Siavoshian, S., Blottiere, H. M., Cherbut, C. & Galmiche, J. P. Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **232**, 169-72. (1997).
219. Siavoshian, S. et al. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* **46**, 507-14. (2000).
220. Sies, H. & Stahl, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* **62**, 1315S-1321S. (1995).
221. Souleimani, A. & Asselin, C. Regulation of C-fos expression by sodium butyrate in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Biochem Biophys Res Commun* **193**, 330-6 (1993).
222. Sowa, Y., Orita, T., Minamikawa, S., Nakano, K., Mizuno, T., Nomura, H. & Sakai, T. Histone deacetylase inhibitor activates the Waf1/Cip1 gene promoter through the Sp1 site. *Biochem Biophys Res* **241**, 142-50. (1997).

223. Spiegelman, B. M. & Flier, J. S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* **87**, 377-89. (1996).
224. Sporn, M. B., Dunlop, N. M., Newton, D. L. & Henderson, W. R. Relationships between structure and activity of retinoids. *Nature* **263**, 110-3. (1976).
225. Stahl, W. & Sies, H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys* **336**, 1-9. (1996).
226. Stahl, W., von Laar, J., Martin, H. D., Emmerich, T. & Sies, H. Stimulation of gap junctional communication: comparison of acyclo-retinoic acid and lycopene. *Arch Biochem Biophys* **373**, 271-4. (2000).
227. Stein, B. et al. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *Embo J* **12**, 3879-91 (1993).
228. Stephen, A. M. & Cummings, J. H. Mechanism of action of dietary fibre in the human colon. *Nature* **284**, 283-4 (1980).
229. Stich, H. F., Mathew, B., Sankaranarayanan, R. & Nair, M. K. Remission of oral precancerous lesions of tobacco/areca nut chewers following administration of beta-carotene or vitamin A, and maintenance of the protective effect. *Cancer Detect Prev* **15**, 93-8. (1991).
230. Stivala, L. A. et al. The antiproliferative effect of beta-carotene requires p21waf1/cip1 in normal human fibroblasts. *Eur J Biochem* **267**, 2290-6. (2000).
231. Stoll, B. A. Linkage between retinoid and fatty acid receptors: implications for breast cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* **11**, 319-25. (2002).
232. Straus, D. S. et al. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4844-9 (2000).
233. Suh, N. et al. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* **59**, 5671-3. (1999).
234. Temple, N. J. & Basu, T. K. Protective effect of beta-carotene against colon tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* **78**, 1211-4. (1987).
235. Thacher, S. M., Vasudevan, J. & Chandraratna, R. A. Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. *Curr Pharm Des* **6**, 25-58. (2000).
236. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* **330**, 1029-35. (1994).
237. Thomas, M. J. & Seto, E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* **236**, 197-208 (1999).
238. Thompson, M. A. et al. c-Myb down-regulation is associated with human colon cell differentiation, apoptosis, and decreased Bcl-2 expression. *Cancer Res* **58**, 5168-75. (1998).
239. Thompson, E. A. PPAR-gamma physiology and pathology in gastrointestinal epithelial cells. *Mol. Cells* **24**, 167-76. (2007)

240. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I. & Spiegelman, B. M. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* **8**, 1224-34. (1994).
241. Tontonoz, P. et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 237-41. (1997).
242. Truscott, T. G. Beta-carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. *J Photochem Photobiol B* **35**, 233-5. (1996).
243. Tumorzentrum München. Manual Gastrointestinale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 7. Auflage München: Zuckschwerdt (2006).
244. Uesugi, Y., Fuse, I., Toba, K., Kishi, K., Furukawa, T., Koike, T. & Aizawa, Y. Involvement of SHP-1, a phosphotyrosine phosphatase, during myeloid cell differentiation in acute promyelocytic leukemia cell lines. *Eur J Haematol* **62**, 239-45. (1999).
245. van Poppel, G. Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention studies. *Eur J Cancer* **29A**, 1335-44. (1993).
246. van Poppel, G. & Goldbohm, R. A. Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. *Am J Clin Nutr* **62**, 1393S-1402S. (1995).
247. van Eenwyk, J., Davis, F. G. & Bowen, P. E. Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* **48**, 34-8. (1991).
248. Wächtershauser, A., Loitsch, S. M. & Stein, J. PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 380-5 (2000).
249. Wächtershäuser, A. & Stein, J. Butyratinduzierter Anstieg von PPAR γ beruht neben erhöhter Genexpression möglicherweise auch auf Hemmung des Proteasoms. Akt Ern Med, Abstraktband des Kongresses Nutrition 2002, Luzern. (2002).
250. Wahlqvist, M. L. et al. Changes in serum carotenoids in subjects with colorectal adenomas after 24 mo of beta-carotene supplementation. Australian Polyp Prevention Project Investigators. *Am J Clin Nutr* **60**, 936-43. (1994).
251. Wald, N. J., Thompson, S. G., Densem, J. W., Boreham, J. & Bailey, A. Serum beta-carotene and subsequent risk of cancer: results from the BUPA Study. *Br J Cancer* **57**, 428-33. (1988).
252. Wang, C. J., Chou, M. Y. & Lin, J. K. Inhibition of growth and development of the transplantable C-6 glioma cells inoculated in rats by retinoids and carotenoids. *Cancer Lett* **48**, 135-42. (1989).
253. Wang, W. & Higuchi, C. M. Induction of NAD(P)H:quinone reductase by vitamins A, E and C in Colo205 colon cancer cells. *Cancer Lett* **98**, 63-9. (1995).
254. Weaver, G. A., Krause, J. A., Miller, T. L. & Wolin, M. J. 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* **29**, 1539-43 (1988).

255. Weinstein, I. B. Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* **21**, 857-64. (2000).
256. Williams, A. W., Boileau, T. W., Zhou, J. R., Clinton, S. K. & Erdman, J. W., Jr. Beta-carotene modulates human prostate cancer cell growth and may undergo intracellular metabolism to retinol. *J Nutr* **130**, 728-32. (2000).
257. Witt, O., Sand, K. & Pekrun, A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* **95**, 2391-2396 (2000).
258. Wolbach, S. B. & Howe, P. R. Nutrition Classics. The Journal of Experimental Medicine 42: 753-77, 1925. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. S. Burt Wolbach and Percy R. Howe. *Nutr Rev* **36**, 16-9. (1978).
259. Wolterbeek, A. P., Roggeband, R., Baan, R. A., Feron, V. J. & Rutten, A. A. Relation between benzo[a]pyrene-DNA adducts, cell proliferation and p53 expression in tracheal epithelium of hamsters fed a high beta-carotene diet. *Carcinogenesis* **16**, 1617-22. (1995).
260. Wright, H. M. et al. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **275**, 1873-7 (2000).
261. Xiao, J. H. et al. Adenomatous polyposis coli (APC)-independent regulation of beta-catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway. *J Biol Chem* **278**, 29954-62. (2003).
262. Yang, F. G., Zhang, Z. W., Xin, D. Q., Shi, C. J., Wu, J. P., Guo, Y. L. & Guan, Y. F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 753-61. (2005).
263. Yoshida, M., Nomura, S. & Beppu, T. Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res* **47**, 3688-91 (1987).
264. Yoshida, M. & Beppu, T. Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A. *Exp Cell Res* **177**, 122-31 (1988).
265. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. & Beppu, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* **265**, 17174-9 (1990).
266. Young, G.P. & Gibson, P.R. Butyrate and the human cancer cell. In „Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids.“ Cambridge University Press, Cambridge, 87-105. (1995).
267. Yu, K. et al. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* **270**, 23975-83. (1995).
268. Yu, V. C. et al. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* **67**, 1251-66 (1991).
269. Zhang, L. X., Cooney, R. V. & Bertram, J. S. Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* **52**, 5707-12. (1992).
270. Zhang, T. et al. Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal

- neoplasia (Min) mice and human familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* **57**, 169-75. (1997).
271. Ziegler, R. G. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J Nutr* **119**, 116-22. (1989).
272. Ziegler, R. G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am J Clin Nutr* **53**, 251S-259S. (1991).
273. Zweibaum, A. et al. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol* **122**, 21-9. (1985).

Danksagung

Ich möchte danken

- Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach für die Möglichkeit, dieses Thema bearbeiten und die Untersuchungen in seinem Labor durchführen zu können sowie für die Übernahme des Referats nach all den Jahren;
- Herrn Prof. Dr. med. A. Geier für die Übernahme des Korreferats;
- dem Team des Gastrolabors der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg für die geduldige praktische und moralische Unterstützung bei den Versuchen: Frau Kerstin Backhaus, Frau Gerda Dusel, Frau Elisabeth Kelber und Frau Donata Kuhn;
- meinen Betreuern, Herrn PD Dr. med. Th. P. Menzel und Herrn PD Dr. med. H. Lührs für ihre fachliche und technische Betreuung;
- Herrn PD Dr. med. J. Schauber, Herrn Dr. med. F. Kreth und den anderen Kolleginnen und Kollegen aus dem Gastrolabor Würzburg;
- insbesondere auch Herrn Dr. Th. Kudlich für seine geduldige fachliche Begleitung;
- meiner Frau Martina und Senhor Ferreira für ihre nimmermüde Motivation.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Friedmar Weber
Geburtsdatum: 21.11.1974
Geburtsort: Neumarkt i.d. Oberpfalz
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

09/1981 – 07/1985 Grundschule Neumarkt
09/1985 – 05/1994 Ostendorfer Gymnasium Neumarkt

Zivildienst

09/1994 – 10/1995 Evangelisches Alten- und Pflegeheim Neumarkt

Hochschulbildung

11/1995 – 08/1997 Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
09/1997 Physikum
11/1997 – 04/2001 Klinisches Studium an der Universität Würzburg
09/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001 – 03/2002 Praktisches Jahr
05/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion bei Prof. Dr. Scheppach, Medizinische Klinik der Universität Würzburg
Thema: „Mechanismen der Modulation der Kolonkarzinogenese durch definierte Nahrungsbestandteile wie Lycopin und beta-Carotin“
Posterpräsentationen in Frankfurt, Wien und Atlanta (Digestive Disease Week 2001)

Praktische Ausbildung

05/1996 – 07/1997 regelmäßige Tätigkeit als stud. Hilfskraft, Gefäßchirurgie, Universität Regensburg
03/1998 Famulatur, Innere Medizin, Klinikum Neumarkt
10/1998 Famulatur, Chirurgie, Missionsärztliche Klinik Würzburg
03/1999 Praxis-Famulatur, Pädiatrie, Kinder- und Jugendpsychiatrie, Würzburg
08/1999 – 10/1999 Famulatur, Innere Medizin, Chirurgie, Gynäkologie, Sacred Heart Hospital, Abeokuta, Nigeria
05/2000 – 03/2001 regelmäßige Tätigkeit als stud. Hilfskraft, Infektiologie, Universität Würzburg
04/2001 – 08/2001 1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik Würzburg
08/2001 – 11/2001 2. Tertial des Praktischen Jahres, Gynäkologie, Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi, Ghana
11/2001 – 03/2002 3. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Missionsärztliche Klinik Würzburg

Beruflicher Werdegang

08/2002 – 01/2004 Arzt im Praktikum Medizinische Klinik der Universität Würzburg (Kardiologie, Endokrinologie, Gastroenterologie)
03/2004 – 08/2006 Assistenzarzt II. Medizinische Klinik (Kardiologie), Klinikum Straubing
09/2006 – 02/2012 Assistenzarzt I. Medizinische Klinik (Gastroenterologie, Onkologie), Klinikum Straubing
01/2011 Facharzt für Innere Medizin (nach WBO 1998)
03/2012 Ernennung zum Oberarzt an der I. Medizinischen Klinik, Klinikum Straubing