

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

Modulation der Expression von Integrin- $\beta$ 4, Interleukin-1 $\beta$  und HMGA  
in humanen kolorektalen Karzinomzellen durch Butyrat

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Klaus Burzer  
aus Frankfurt/Main

Würzburg, November 2003

Referent: Prof. Dr. med. W. Scheppach

Korreferent: Prof. Dr. med. H.-J. Gassel

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2004

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Kolonkarzinom	1
1.2	Kurzkettige Fettsäuren	3
1.3	Untersuchte Faktoren Integrin- $\beta$ 4, Interleukin-1 $\beta$ und HMGA	5
1.4	Fragestellung	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Zelllinien und Zellkultur	9
2.2	RNA-Isolierung	10
2.3	Atlas™ cDNA Expression Array (Clontech)	12
2.4	Western Blot	17
2.4.1	SDS-PAGE, Blotten und Färbung	17
2.4.2	Antikörper	18
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
3.1.1	RNA-Integrität und DNA-Kontamination	20
3.1.2	Differentielle mRNA Expression durch Butyrat	20
3.2	Modulation der Expression von Proteinen durch Butyrat	21
3.2.1	Integrin-beta 4	21
3.2.2	Interleukin-1 beta	23
3.2.3	HMGA	24
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Verwendete Abkürzungen</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	



## **1 Einleitung**

### **1.1 Das Kolonkarzinom**

Am kolorektalen Karzinom erkranken in Deutschland jährlich 30 von 100.000 Einwohnern. Es ist damit das zweithäufigste Karzinom bei Männern nach dem Bronchialkarzinom und bei Frauen nach dem Mammakarzinom. Die Patienten sind meist älter als 50 Jahre. Nur 25% gehören einer definierten Risikogruppe an. Dazu zählen Patienten mit bekannten kolorektalen Adenomen, kolorektalen Karzinomen in der Familienanamnese, Colitis ulcerosa, die länger als 15 Jahre besteht, hereditärem nichtpolypösem Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC), auch Lynch-Syndrom genannt, sowie familiärer, adenomatöser Polyposis (FAP). Diese liegt einem Prozent aller kolorektalen Karzinome zugrunde, hat aber zu wesentlichen allgemeinen Erkenntnissen der Tumorgenese geführt. Charakteristisch für die FAP ist eine heterozygote Keimbahnmutation des APC Tumor-Suppressorgens. Die Inaktivierung des zweiten Allels erfolgt durch eine somatische Mutation. Die Tumorsuppressorfunktion des APC-Gens wird vor allem auf dem Wingless (Wnt/Wg)-Signalweg über  $\beta$ -Catenin reguliert. Es entsteht ein Komplex aus APC, GSK-3 $\beta$ , Axin und  $\beta$ -Catenin. Es folgt eine Phosphorylierung und Degradierung von  $\beta$ -Catenin durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg. Mutationen im APC-Gen erhöhen die  $\beta$ -Catenin-Spiegel im Cytoplasma.  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern und bindet an den Transkriptionsfaktor TCF-4. Dadurch werden Proliferations- und Transformations-Faktoren in ihrer Expression gesteigert, zum Beispiel c-myc, Cyclin D1, PPARdelta und c-jun. 70% aller sporadischen kolorektalen Karzinome besitzen Mutationen im APC-Gen (131).

Das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC) kommt in 3-6% aller kolorektalen Karzinome vor und folgt auch einem autosomal dominanten Erbgang. Hierbei mutieren DNA-Mismatch-Reparatur-Gene (hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1, hPMS2). Fast alle Tumore von HNPCC-Patienten weisen eine Mikrosatelliteninstabilität (Insertionen oder Deletionen in repetitiven DNA-Sequenzen) auf. Diese ist mit Mutationen (BAX, TGF $\beta$ -Rezeptortyp 2, CDX2, E2F-4, TCF-4) in kodierenden DNA-Sequenzen verbunden. In 15% aller sporadischen kolorektalen Karzinome kommt eine Mikrosatelliteninstabilität vor (131).

Nach der Adenom-Karzinom Sequenz von Fearon und Vogelstein entstehen kolorektale Karzinome (CRC) aus Adenomen durch eine Serie von somatischen Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen (132). Dabei findet man genetische Veränderungen im APC-Gen bereits bei den frühesten Alterationen in der Adenom-Karzinom Sequenz. K-Ras-Mutationen sieht man in ungefähr 50% der CRC. Der Nachweis von inaktivierenden Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 gelingt in mehr als 50% der CRC als spätes Ereignis in der Adenom-Karzinom Sequenz. Mehr als 70% aller Tumore zeigen einen 18q Allelverlust (LOH) und damit einen Verlust der potentiellen Tumorsuppressorgene SMAD2, SMAD4 und DCC.

Auch epigenetische Phänomene wie die Überexpression von COX-2 kommen in 43% der Adenome und 86% der Karzinome vor (133).

Die Größe (kleiner 1cm: 1-2% Karzinomrisiko; größer 2cm: 40-50% Karzinomrisiko) und der histologische Typ (tubuläres Adenom: 5%; villöses Adenom: 40%) spielen für das Risiko, ein Karzinom zu entwickeln, eine große Rolle. Die Tumorgenese erstreckt sich im Mittel über 5-10 Jahre.

Die Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms ist folgender Tabelle zu entnehmen.

UICC	DUKES	TNM-SYSTEM	Definition
0		TIS N0 M0	Carcinoma in situ
I	A	T1 N0 M0 T2 N0 M0	Ia: Beschränkung auf Mukosa und Submukosa Ib: Infiltration Muscularis propria
II	B	T3 N0 M0 T4 N0 M0	Infiltration aller Wandschichten Überschreiten der Darmwand
III	C	Tx N1-3 M0	Regionale Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung
IV	D	Tx Nx M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Zu 60% ist das kolorektale Karzinom im Rektum lokalisiert, zu 20% im Sigma, zu 10% im Coecum und Colon ascendens sowie zu 10% im übrigen Kolon. Lymphogene und hämatogene Metastasierung sind im fortgeschrittenen Stadium möglich (137).

Da das kolorektale Karzinom keine zuverlässigen Frühsymptome zeigt, ist im Rahmen der Prophylaxe auf Blutbeimischung im Stuhl (8), jede plötzliche Änderung der Stuhlgewohnheit, Leistungsminderung, Darmverschluss und Blutungsanämie zu achten.

Nur durch regelmäßige prophylaktische Koloskopie je nach Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe (bei normalem Risiko ab dem 55. Lebensjahr) ist eine sichere Frühdiagnose mit hoher Heilungschance möglich.

Die Behandlung des kolorektalen Karzinoms erfolgt chirurgisch, mit Chemo- und Radiotherapie. Als Standardchemotherapie (adjuvant im Stadium UICC III, palliativ im Stadium UICC IV) gilt noch 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Folinsäure. Kombinationsschemata mit Irinotecan oder Oxaliplatin sowie orale 5-FU-Prodrugs werden in Zukunft die therapeutischen Möglichkeiten deutlich erweitern (134).

Epidemiologische Studien zeigen, daß das Risiko, am kolorektalen Karzinom zu erkranken, durch fettreiche, fleischreiche, ballaststoffarme Kost, langjähriges Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum erhöht wird (1,2).

Potentiell protektive Faktoren sind ballaststoffreiche Ernährung mit regelmäßiger Obst- und Gemüsezufuhr (3), eine schnelle Stuhlpassage, Acetylsalicylsäure (4,5,6), Vitamin C, Vitamin D3 und Calcium (7).

## **1.2 Kurzkettige Fettsäuren**

Als Ballaststoffe werden hauptsächlich im Dünndarm enzymatisch unverdauliche Kohlenhydrate und Proteine bezeichnet. Sie beschleunigen die intestinale Transitrate, vergrößern das Stuhlvolumen durch Quellung und absorbieren Karzinogene (9).

Im Coecum und Colon ascendens erfolgt die Fermentation, d.h. ein anaerober Abbau der Ballaststoffe, die vor allem aus Nicht-Stärke-Polysacchariden und resistenter Stärke (10,11) bestehen, durch Kolonbakterien (12).

Dabei entstehen Gase und kurzkettige Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat im proximalen Colon im molaren Verhältnis 60:25:15 mmol/l (13). Die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren nimmt nach distal ab (14).

Bei typisch westlicher, fettreicher und ballaststoffarmer Ernährung wird eine Aufnahme von 20g Ballaststoffen täglich beobachtet. Daraus entstehen ungefähr 200mmol/l kurzkettige Fettsäuren. 10% davon werden im Stuhl ausgeschieden (15).

Dagegen werden in Ländern der Dritten Welt (z.B. Afrika) 150g Ballaststoffe pro Tag aufgenommen (16).

Die kurzkettigen Fettsäuren sind die Hauptenergiequellen der Kolonmukosa (17). Im Vordergrund steht n-Butyrat, das zu Kohlendioxid und Ketonkörpern verstoffwechselt wird und das Wachstum der normalen Kolonschleimhaut stimuliert (18). Dabei wird die Zellproliferation an der Kolonkryptenbasis, der physiologischen Proliferationszone, gesteigert. In den oberen Kryptenbereichen ist eine Hemmung der Proliferation sowie eine Differenzierungsinduktion der Zellen nachweisbar (19).

Die Metabolisierung von n-Butyrat wird vor allem im distalen Kolon dem Abbau von Glucose und Glutamin vorgezogen (20).

Bei Kolonkarzinomzelllinien und im Tiermodell hemmt Butyrat die Zellproliferation und steigert den Differenzierungsgrad der Zellen, was sich unter anderem in der vermehrten Aktivierung der alkalischen Phosphatase und der vermehrten Expression des carcinoembryonalen Antigens (CEA), zweier Bürstensaumenzyme, zeigt (21). Zusätzlich induziert Butyrat die Apoptose und hemmt die Karzinogenese (22,23).

Die Mechanismen der Butyratwirkung auf zellulärer Ebene sind noch nicht vollständig erforscht. Allerdings gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen zu diesem Thema.

Durch Inhibition der Histondeacetylase wird eine Hyperazetylierung der Histone H3 und H4 induziert. Sie ist an der räumlichen Anordnung des Zellchromatins beteiligt (24,25,26). Dabei wird ähnlich dem spezifischen Histondeazetylasehemmer Trichostatin die Genexpression verändert (27,28). Außerdem wird die DNA-Hypermethylierung und die Modulation der DNA-Transskription gefördert (29).

Die mögliche positive Rolle von Butyrat zur Prävention des kolorektalen Karzinoms zeigt die negative Korrelation von fäkalen Butyratspiegeln und der Tumormasse bei Ratten, die mit einer kohlenhydratreichen Nahrung gefüttert wurden (9). Bei den gleichen Versuchstieren wurden durch Azoxymethan Kolontumoren induziert. Weizenreiche Nahrung erhöhte die fäkalen Butyratspiegel, senkte die Proliferation, induzierte Apoptose und verringerte die Zahl

von Tumorstufen (23). Bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen ist der fäkale Butyratanteil an den kurzkettigen Fettsäuren im Vergleich zu der Kontrollgruppe erniedrigt (135).

In unserer gastroenterologischen Arbeitsgruppe wurden bereits zahlreiche positive Effekte von Butyrat auf Kolonkarzinomzellen dargestellt. So senkt zum Beispiel Butyrat die Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in kolorektalen Karzinomzellen (127) und es erfolgt eine Modulation der HMG-N2-Bindung an Chromatin durch Butyrat-induzierte Azetylierung in menschlichen Kolonadenokarzinomzellen (129).

### **1.3 Untersuchte Faktoren Integrin- $\beta$ 4, Interleukin-1 $\beta$ und HMGA**

#### **Integrin-beta 4**

Integrine sind Heterodimere, die aus nicht kovalent gebundenen transmembranösen alpha- und beta-Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die 16 alpha- und 8 beta-Untereinheiten heterodimerisieren, um mehr als 20 unterschiedliche Rezeptoren zu produzieren (71,72). Die meisten Integrin-Rezeptoren binden Liganden, die Komponenten der extrazellulären Matrix sind, einschließlich Fibronectin, Kollagen und Vitronectin. Bestimmte Integrine können auch an lösliche Liganden binden wie z.B. Fibrinogen oder auch an sogenannte Gegenrezeptoren angrenzender Zellen wie z.B. die intrazellulären Adhäsionsmoleküle (ICAMs). Diese Interaktion führt dann zu einer Zellaggregation (72). Liganden dienen dazu, Integrine querzuverbinden oder zu bündeln. Dies geschieht durch die Bindung an angrenzende Integrin-Rezeptoren. Sowohl die Bündelung der Rezeptoren als auch die Liganden-Belegung sind nötig, um Integrin-vermittelte Antworten zu aktivieren (73). Zusätzlich zur Zelladhäsionswirkung und der zytoskeletalen Organisation funktionieren Integrine als signalgebende Rezeptoren. Integrin-vermittelte Signale spielen eine Rolle in vielen biologischen Prozessen, einschließlich Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose (74,75). Integrin-beta 4, auch genannt GP 150 oder CD 104, ist erforderlich für die Hemidesmosomenbildung, Zell-Adhäsion und Zell-Überleben. Diese Funktionen werden über die alpha 6-Untereinheit vermittelt (71). In mehrreihigem Epithel verbindet sich das Integrin-Heterodimer alpha 6-beta 4 mit BPAG1-e und BPAG2, um Hemidesmosomen zu bilden. Außen besteht eine Befestigung an Laminin, innen an das Keratinzytoskelett (71). Nach der

Bindung an Liganden wird das alpha 6-beta 4-Integrin am Tyrosin-Rest phosphoryliert und verbindet sich daraufhin mit den Adapter-Molekülen Shc und Grb2, die sich dem ras-Pfad anschließen, sowie mit zytoskeletalen Elementen der Hemidesmosomen (72). Das alpha 6-beta 4-Integrin weist bei epithelialen Tumoren darüber hinaus eine Tumor-Suppressor-Aktivität auf (73). Alpha 6-beta 4-Integrin wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Die Regulation erfolgt durch den EGF-Rezeptor (EGFR), der insbesondere in vielen Epithelien und in Schwann-Zellen exprimiert ist. Die Änderungen in der alpha 6-beta 4-Funktion, induziert durch EGF, dürften bei der Wundheilung und der Tumorgenese eine Rolle spielen (71,72). Viele Formen von Integrin-beta 4 dürften existieren entsprechend dem zelltypischen, spezifischen Splicing (74).

Die klinische Bedeutung des Integrin-beta 4 zeigt sich bei der junctionalen, bullösen Epidermolyse (JEB). Dies ist eine heterogene, vererbliche, blasenbildende Erkrankung menschlicher epithelialer Basalmembranen. Ein Defekt in der beta-4-Expression definiert wohl eine Teilmenge von JEB-Fällen, die sich auch mit Pylorusatresie darstellen (75).

#### Interleukin-1 beta

Interleukin-1 beta gehört zur Familie der Interleukine, von der mittlerweile 15 Vertreter beschrieben sind. Zwei Formen von Interleukin-1, genannt Interleukin-1 alpha und Interleukin-1 beta, wurden beschrieben (92,93). Obwohl sie durch verschiedene Gene kodiert werden und ungefähr nur 25% Sequenzidentität aufweisen, binden Interleukin-1 alpha und beta an den gleichen Rezeptor und scheinen ähnliche biologische Antworten auszulösen. Beide Proteine werden als 31 kD-Vorläufer synthetisiert, die zu 17 kD reifen Polypeptiden angefertigt werden (92,93). Die Interleukin-1-Produktion ist hauptsächlich mit Entzündung vergesellschaftet, aber es wird augenscheinlich auch während der Nierenentwicklung, der Thymozyten-Differenzierung und des Knorpelabbaus exprimiert (94-96). Interleukin-1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort und Entzündung, indem es als Aktivator von T- und B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK) arbeitet. In T-Zellen stimuliert Interleukin-1 die Produktion von Interleukin-2 und hemmt selektiv die Interleukin-4- Expression (97). Interleukin-1 induziert B-Zell-Proliferation, Reifung und Immunglobulinsynthese (97). Natürliche Killerzellen benötigen Interleukin-1 beta zur Produktion des antipathogenen Interferon-gamma (IFN-gamma) (98). Interleukin-1 ist auch an verschiedenen pathologischen

Zuständen einschließlich der rheumatoiden Arthritis, der entzündlichen Darmerkrankungen und Atherosklerose beteiligt (98).

## HMG

Die „high mobility group“ (HMG) chromosomalen Proteine wurden in Säugetierzellen vor mehr als 30 Jahren entdeckt und entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in Polyacrylamid-Gelen bezeichnet. Nachfolgende Studien haben gezeigt, daß die funktionellen Motive, die für die originalen, canonischen HMG-Proteine charakteristisch sind, weitverbreitet sind unter nukleären Proteinen verschiedener Organismen.

Die Nomenklatur der HMG-nukleären Proteine wurde 2001 revidiert (136). Die HMG Proteine sind unterteilt in 3 Gattungen oder Oberfamilien: HMGB, HMGN, HMGA. Das funktionelle Motiv der HMGB-Familie wird die „HMG-Box“ genannt, das der HMGN-Familie „nucleosomale Bindungsdomäne“ und das der HMGA-Familie „AT-Haken“. Proteine, die eines dieser funktionellen Motive eingebettet in ihre Sequenz enthalten, werden als „HMG-Motiv Proteine“ bezeichnet (136).

Signifikanterweise binden all diese funktionellen Motive an spezielle Strukturen in der DNA oder im Chromatin mit geringer, wenn überhaupt mit irgendeiner Spezifität zur Ziel-DNA-Sequenz. Alle HMG-Proteine funktionieren als Architekturelemente, die die Struktur von DNA und Chromatin modifizieren, um eine Konformation zu erzeugen, die verschiedene DNA-abhängige Aktivitäten wie Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur erleichtert und verstärkt. Die funktionellen Motive, die für die HMGB- und HMGA-Unterfamilien (32,33) charakteristisch sind, wurden in zahlreichen Kernproteinen identifiziert, die mit DNA und Chromatin interagieren. Jedoch muß man die archetypischen HMG-Proteine unterscheiden von den Proteinen, die diese HMG-Motive eingebettet in ihre Primärsequenz enthalten. Die erstgenannten (HMG-Proteine) sind allgegenwärtig in allen Zellen höherer Eukaryonten, sind zahlreich und binden an DNA in einer sequenzunabhängigen Art. Die letzteren sind zelltypspezifisch, nicht zahlreich, binden an DNA in einer sequenzspezifischen Art und enthalten meist zusätzliche unterschiedliche nicht-HMG-funktionelle Motive. Im Hinblick auf die biologische Bedeutung der HMG-Motive ist es wichtig, ihre relative Häufigkeit im Kern zu berücksichtigen. Selbst kleine Fluktuationen der zellulären Spiegel

dieser zahlreichen Proteine haben signifikante biologische Konsequenzen, da die Expression bestimmter Gene durch strukturelle Veränderungen in einem einzelnen Nukleosom affiziert werden kann (34,35,36).

Der AT-Haken bindet Proteine an den kleineren Sulkus der DNA und streckt diesen Sulkus. Detaillierte Studien über die Interaktion von HMGA-Protein mit der beta-Interferon (IFN- $\beta$ )-Verstärkersequenz legen nahe, daß der AT-Haken intrinsische Verdrehungen in der DNA-Konformation rückgängig machen und vermeiden könnte (32,33,37). Auch die Regionen außerhalb des AT-Haken-Motivs tragen zur DNA-Bindung bei (38). Die Spezifität dieser Regionen wird weiterhin verstärkt durch posttranslationale Modifizierungen, von denen einige Zellzyklus-reguliert sind (39,40). Die HMGA-Expression ist bei vielen malignen Erkrankungen signifikant hochreguliert (47,57,58,56). Deshalb könnten erhöhte Spiegel dieser Proteine potentiell auch zur Diagnostik transformierter Zellen eingesetzt werden.

#### **1.4 Fragestellung**

Im gastroenterologischen Labor konnte gezeigt werden, daß Butyrat die Proliferation von Kolonkarzinomzellen hemmt und ihre Apoptose und Differenzierung induziert.

Zur Klärung der zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen wird zunächst die differenzielle Induktion der mRNA Expression durch Butyrat mittels cDNA Expression Array an HT29 Kolonkarzinomzellen untersucht.

Die daraus resultierenden Erkenntnisse werden anschließend auf Proteinebene verifiziert. Bei je einem Faktor aus den für die Karzinogenese wichtigen Bereichen der Zelladhäsion (Integrin-beta 4), der Entzündung (Interleukin-1 $\beta$ ) und der Transkription (HMGA) werden anhand von Kolonkarzinomzelllinien mittels Western Blot die entsprechenden Untersuchungen durchgeführt.

Ziel ist es, die Regulation von wichtigen intrazellulären Faktoren durch exogenes Butyrat zu beschreiben.

Aus diesen Ergebnissen sind potentiell mögliche interventionelle Aktivitäten abzuleiten.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zelllinien und Zellkulturen**

Drei kolorektale Karzinomzelllinien wurden untersucht. Die HT-29-Zelllinie (ATCC HTB-38) wurde 1964 von J. Fogh aus einem gut differenzierten Kolonadenokarzinom (Primärtumor, Grad 1) einer 44-jährigen, weißen Patientin isoliert. Die Zelllinie exprimiert CEA (30). Die SW-480-Zelllinie (ATCC CCL-228) wurde 1976 von A. Leibovitz aus einem undifferenzierten Kolonadenokarzinom (Grad 4, Duke B) eines 50 Jahre alten, weißen Patienten isoliert. Es wurde CEA, Keratin, transformierender Wachstumsfaktor beta sowie GM-CSF produziert (31). Die SW-620-Zelllinie (ATCC CCL-227) wurde 1976 von A. Leibovitz aus einem Lymphknoten einer Metastase des entdifferenzierten kolorektalen Adenokarzinoms der SW-480-Zelllinie isoliert. Die Zellen produzieren CEA, transformierenden Wachstumsfaktor alpha (TGF- $\alpha$ ), Keratin und Matrilysin (31). Alle drei Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) bezogen.

Sie wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Begasung (Heraeus-Brutschrank B 5060, Heraeus Hanau) inkubiert. Für die HT-29 Zellen war das Medium 85.6% Minimum Essential Medium, 10% FBS, 1% Glutamin, 2% Penicillin/Streptomycin, 1% NEAA und 0,4% HEPES Buffer. Für die SW-480 Zellen war das Medium 90% RPMI1640 und 10% FBS. Für die SW-620 Zellen benutzten wir als Medium 85% DMEM, 10% FBS und 5% Penicillin/Streptomycin (alle: Life Technologies, Paisley, UK).

In 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Costar, Cambridge MA, USA) wurden 10<sup>6</sup> Zellen ausgesät. Es folgte eine Inkubation über 72h bei 37°C. Zur Zellwachstumssynchronisation wurden die Zellen nun 6h in serumfreiem Medium inkubiert. Nach Ersatz durch 10% FBS-Medium und weiteren 12h Inkubation wurden die Zellen unter Zugabe von Butyrat in 2,4 oder 6 mmolarer Konzentration für 12,24,48 oder 72h inkubiert. Butyrat wurde in Aqua dest. gelöst. Als Kontrollsubstanz diente jeweils Medium. Zum Zeitpunkt 0,12,24,48 und 72h wurde der Medienüberstand abpipettiert und die adhären wachsenden Zellen durch Trypsinierung vom Kulturflaschenboden gelöst. Dazu wurden die Zellen mit 5ml PBS (PBS Dulbecco's, Life Technologies) gewaschen. Es wurde 4ml Trypsin (Trypsin-EDTA 1%, Life Technologies) in

die Kulturflasche gegeben und nach einigen Sekunden wieder abgesaugt. Es wurde erneut 3ml Trypsin zugegeben und 5min bei 37°C inkubiert.

Die SW-620 Zellen wurden 4min bei Raumtemperatur trypsiniert. Durch Beklopfen der Zellkulturflasche wurden die Zellen von der Unterlage gelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 7,5ml Medium und 10% FBS gestoppt. Für die Zellzählung und Trypanfärbung wurden 0,5ml dieser Suspension entnommen. Es folgte eine Zentrifugierung der restlichen Zellen mit 900RPM über 10min (Labofuge 400R, Kendro, Hanau). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet in 10ml PBS resuspendiert, wiederum für 10 Minuten bei 4°C mit 900RPM zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Endlich wurde das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert, in ein silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß (Sorenson, West Salt Lake City, Utah, USA) überführt und zentrifugiert (10min, 4°C, 12000RPM). Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -80°C gelagert und die Zellen im Western Blot weiteranalysiert.

Die zur Zellzählung entnommene Zellsuspension wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,5ml Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%, Life Technologies) vermischt. 10µl davon wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierbei konnten vitale (Trypan-negativ) und avitale (Trypan-positiv) Zellen durch ihr unterschiedliches Färbeverhalten unterschieden werden.

### **2.2.1 RNA-Isolierung**

Die Gesamt-RNA wurde aus den Kulturzellen mittels RNeasy Mini Kit (Quiagen) isoliert. Die vollständige Lösung der abgelösten und pelletierten Zellen ( $5-10 \times 10^6$ ) erfolgte in 600µl Lysisbuffer (RLT-Buffer: 1% β-Mercaptoethanol, Guanidinium-Isothiocyanat, Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Es folgte die Auftragung der Lysate auf eine RNeasy shredder column (Quiagen) und die Zentrifugierung über 2min bei RT und 1400rpm. Die Eluate wurden mit 600µl 70% Ethanol gemischt, in 2 Schritten auf die mitgelieferten Säulen gegeben und 1min bei RT und 1400rpm zentrifugiert (Kendro, Hanau). 700µl Buffer RW1 (Guanidinium-Isocyanat-haltig) und zweimal Buffer RPE (Ethanolhaltig) wurden zum Waschen der Säulen verwendet. Eluiert wurde mit zweimal 30µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Diethylpyrocarbonat (DEPC) 0,05% in ddH<sub>2</sub>O



ad 10ml DEPC-H<sub>2</sub>O

1x FA Gel Loading Buffer:      100ml 10x FA Puffer  
    20µl Formaldehyd (37%)  
    ad 1l DEPC-H<sub>2</sub>O

Um die Qualität der isolierten RNA zu beurteilen, erfolgte die Auftragung von 1µg RNA auf ein 1,2% Formaldehyd/Agarosegel. Dazu wurde 1,2g Agarose und 10ml 10x FA Gel Puffer mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100ml aufgefüllt und in einer Mikrowelle (Philipps, Hamburg) solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig löste. Nach Abkühlung auf 65°C erfolgte die Zugabe von 1,8ml 37% Formaldehyd und 1µl Ethidiumbromid (10mg/ml) sowie der Guß in eine horizontale Gelkammer. Einem µg RNA wurde 5x RNA-Ladepuffer zugemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der RNA geschah bei 100V in 1x FA Gel Loading Buffer. Man sah die RNA-Banden aufgrund der Interaktion von Ethidiumbromid mit der RNA bei UV-Licht (312nm). Die scharfe Detektion der ribosomalen RNA-Untereinheiten 28S und 18S im Verhältnis 1,5-2,5:1 wurde als Gütekriterium der RNA festgelegt. Die Gele wurden mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Biodoc, Biometra, Göttingen) dokumentiert.

### **2.3 Atlas ä cDNA Expression Array (Clontech)**

HT-29 Kolonkarzinomzellen wurden über 24h mit 4mM Butyrat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) inkubiert, wobei Medium die Kontrolle war. Es folgte eine RNA-Aufreinigung und die cDNA-Synthese mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP-Markierung (10µCi/µl, Amersham, Little Chalfont, UK). Sodann wurden die Butyrat- und die Kontrollprobe mit den 1176 komplementären cDNA-Abschnitten auf der positivgeladenen Nylonmembran (BrightStar-Plus™, Ambion. TX, USA), (Atlas Human 1.2 Array, Clontech; komplette Genliste: <http://www.clontech.com/atlas/genelists>) hybridisiert. Die radioaktiv markierten Abschnitte wurden nach mehreren Waschschritten auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Bioscience, Freiburg) sichtbar gemacht.

#### **2.3.1 DNase Behandlung (nach Clontech)**

10x DNase Puffer:                      400mM Tris-HCL (pH 7,5), Merck, Darmstadt



nach Abkühlen auf ca. 65°C:

10mg/ml Ethidiumbromid

Zur Erfolgskontrolle der DNase-Behandlung wurde eine Polymerase Chain Reaction (PCR) durchgeführt. Dabei wurde ein DNA-Abschnitt (G<sub>3</sub>DPH) durch eine hitzestabile Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) zwischen synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primer) amplifiziert. Mittels Ethidiumbromid wurde das PCR-Produkt nach Auftrennung durch ein Agarosegel sichtbar gemacht. 1µg der Gesamt-RNA wurde kontrolliert (Positivkontrolle: 1µl synthetisch hergestellte G<sub>3</sub>DPH-DNA). Zuletzt wurde die Taq-Polymerase zugesetzt:

Substanz	Konzentration	Menge
1µg RNA	1µg RNA/14,7µl H <sub>2</sub> O	14,7µl
PCR-Puffer	10x	2,0µl
dNTP, Promega GmbH Mannheim	2,5mM	1,0µl
Primer 1	10mM	1,0µl
Primer 2	10mM	1,0µl
Taq-Polymerase		0,3µl
		20µl

Tabelle 2: Pipettierschema für die Polymerase Chain Reaction (PCR)

Folgende G<sub>3</sub>DPH-Primer-Sequenzen wurden eingesetzt: 5`-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3` und 5`-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3` (MWG-Biotech AG, Ebersberg).

Die DNA wurde mittels eines Thermocyclers (Thermocycler GenAmp® PCR-System 9700, PE Applied Systems, Rodgau-Jügesheim) unter folgenden Bedingungen amplifiziert. Zunächst erfolgte eine Denaturierung über 5min bei 94°C. Nun kamen 30 Zyklen mit 30sec Denaturierung bei 94°C, 30sec Annealing bei 60°C und 1min Synthese bei 72°C. Zuletzt erfolgte eine Kühlung auf 4°C.

Das PCR-Produkt wurde in einem 1,5% Agarosegel nachgewiesen. Dazu wurden 1,5g Agarose auf 100ml 1x TBE in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Bei 65°C wurde 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Es folgte die Mischung von 5µl



ad 1l sterilem H<sub>2</sub>O, pH 7

20% SDS: 200g SDS, Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
ad 1l sterilem H<sub>2</sub>O  
bei 65°C lösen

Wash Solution 1: 2x SSC  
1% SDS

Wash Solution 2: 0,1x SSC  
0,5% SDS

Vor der Hybridisierung der Proben mit der Membran erfolgte die Aktivierung der Membran. Diese wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen und 30min bei 68°C mit 10ml ExpressHyb/salmon testes DNA (10µg/ml) in Hybridisierungsflaschen (MWG-Biotech, Ebersberg) unter ständiger Rotation prähybridisiert. Die Hybridisierung (Hybridisierungsöfen Hereus, Hanau) mit den 1176 komplementären cDNA-Abschnitten auf der positiv-geladenen Nylonmembran (Atlas Human 1.2 Array, Clontech) wurde ausschließlich mit der cDNA aus der zweiten und dritten Fraktion der Säulenchromatographie durchgeführt. Zur Vorbereitung der zu untersuchenden cDNA wurden 200µl der markierten Probe (2-10x 1Mio cpm/ml) mit 22µl 10x Denaturation Solution vermischt und für 20min bei 68°C inkubiert. Nach Zugabe von 5µl Cot-1 DNA und 225µl 2x Neutralisation Buffer wurde über 10min bei 68°C inkubiert. Nach Mischung dieser Lösung mit 5ml ExpressHyb/salmon testes DNA (10µg/ml) wurde das Substrat auf die prähybridisierte Membran gegeben. Über Nacht erfolgte die Hybridisierung bei 68°C unter ständigem Schütteln. Danach wurde die Membran 3x mit 68°C warmer Wash Solution 1 sowie 1x mit 68°C warmer Wash Solution 2 gewaschen. Die Membran wurde schließlich kurz auf Filterpapier gelegt, in Plastikfolie verpackt und 1-5 Tage bei -80°C zur Belichtung von Röntgenfilmen verwendet.

## 2.4 Western Blot

### 2.4.1 SDS-PAGE, Blotting und Färbung

Zur Auflösung der Zellpellets wurden 200µl 4°C kalter Lysis buffer benutzt (Tris-HCL 20mM, EGTA 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 50µM, NaF 50mM, Aprotinin 0,01 U/ml, Leupeptin 1µg/ml, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 1µM, Elastinal 1mM, Pepstatin 10µg/ml (pH 7,4; alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, Steinheim, außer Tris-HCL, Merck, Darmstadt)). Eine Ultraschallbehandlung von 10 Sekunden folgte (Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin). Eine Zentrifugierung der Lysate bei 4°C für 5min bei 7500U/min schloß sich an (Eppendorf Centrifuge 5415). Der Überstand wurde in ein neues, silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Photometrisch bei 750nm wurde die Proteinkonzentration der Lysate gegen eine Rinderalbumin-Standardkurve (BSA Fraction V, Boehringer/Mannheim) ermittelt (BioRad DC Protein Assay, BioRad, Hercules CA, USA; Tecan-Spectra-Spektroskop, Tecan, Crailsheim). Den Lysaten wurden 70µl Sample buffer (Glycerol 10%, Laurylsulfat (SDS) 0,4%, Bromphenolblau 0,3% und Pyronin Y 0,2% (alle: Sigma) in 1x Stacking Buffer (Trisbase 0,5M/l, SDS 0,8%) und 20% 2-Mercapto-ethanol (Sigma)) zugegeben. Die Probe wurde durch Vortexbehandlung vermischt, 3min auf 95°C erhitzt und dann 5min auf Eis gekühlt. Mittels SDS-Page (Protean II Cell, BioRad) wurden Proteinproben (10-50µg pro lane) aufgetrennt. Die Polyacrylamidkonzentration (Boehringer/Mannheim) variierte je nach Größe des zu bestimmenden Proteins zwischen 7,5 und 15%. Je höher das Molekulargewicht des gesuchten Proteins war, desto niedriger wurde die Polyacrylamidkonzentration im Gel gewählt. Mindestens eine Geltasche wurde mit 10 µl eines farbig markierten standardisierten Proteingrößenmarkers (SDS-PAGE Standards oder Kaleidoscope Polypeptide Standards, BioRad) geladen. Nach der Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch auf eine PVDF-Membran (Immobilion-membrane, Milipore, Bedford MA, USA) mittels Elektroblothing bei 400-650mA überführt (Trans Blot System, BioRad; EC-Apparatus EC140, EC-Apparatus Co., Holbrook NY, USA). Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte 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

oder 2h bei Raumtemperatur. Nach Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20 (3x30sec, 1x10min) wurde der Primärantikörper appliziert und die Membran für 2h inkubiert. Es folgten mehrere Waschgänge mit TBS 0,1% Tween 20 (3x30sec, 3x15min), ein weiterer Blockierungsschritt in 5% Milchpuffer (30min), Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20 (2x30sec, 1x10min), die Inkubation der Blottingmembran mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper wurde nach weiteren Waschungen (3x30sec, 2x15min) mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK) nachgewiesen. Dabei kommt es zu einer HRP-katalysierten Oxidation von Diazyldiazid und nachfolgender Lichtemittierung. Diese wird durch lichtensitive Filme detektiert (Hyperfilm ECL, Amersham). Die Belichtungszeiten variierten von einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten. Die Blottingmembranen wurden luftdicht in Plastikfolie verpackt, bei 4°C aufbewahrt. Zur Überprüfung gleichmäßiger Proteinbahnenbeladung 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. Die Membran wurde nach Beurteilung der Proteinladung mittels PBS 0,1% Tween 20 wieder entfärbt und weiterbehandelt wie oben angegeben.

#### **2.4.2 Antikörper**

Die verwendeten polyklonalen Primärantikörper (200µg/ml) sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Sie stammten aus dem Kaninchen (rabbit) oder der Ziege (goat). Die Antikörper wurden in der Konzentration 1:1000 in BSA-Puffer (6% BSA, 20mM Tris-HCL, 0,5mM NaCl, 0,1% Natriumazid, pH 7,5) gelöst und die Blottingmembran bei Raumtemperatur inkubiert. Der gegen Kaninchenantikörper und der gegen Ziegenantikörper gerichtete, HRP-konjugierte Sekundärantikörper (200µg/0,5ml), stammte aus dem Esel (donkey). Beide wurden in einer Konzentration von 1:2500 in TBS gelöst. Die Inkubationszeit der Sekundärantikörper (Tabelle 4) betrug eine Stunde.

<b>Antigen</b>	<b>Masse</b>	<b>Typ</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Bindung mit</b>	<b>Positivkontrolle</b>
HMGA (N-19)	A1a 11,55kD A1b 10,55kD	goat IgG	sc-1564	amino terminus	SW 480 SW 620
HMGA (FL-95)	s.o.	rabbit IgG	sc-8982	amino acids 1-95 (=HMGA1b)	SW 480 SW 620
Integrin-beta4 (C-20)	205kD	goat IgG	sc-6628	carboxy terminus	SW 620 SW 480
Interleukin-1beta(C-20)	20kD	goat IgG	sc-1250	carboxy terminus	rekomb. Human IL-1b R&D systems Catalog Nr.: 201-LB

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper im Western Blot  
(sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Typ</b>	<b>Herkunft</b>
anti-goat IgG	donkey	sc-2020
anti-goat IgG	donkey	sc-2056
anti-rabbit IgG	donkey	ECL NA 934 amersham pharmacia biotech

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper im Western Blot  
(sc: Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1.1 RNA-Integrität und DNA-Kontamination**

Nachdem die RNA aus den HT-29 Zellen isoliert war, wurde diese durch eine Agarosegelelektrophorese mit darauffolgender Ethidiumbromidfärbung geprüft. Die 28S und 18S ribosomalen Banden stellten sich dabei bei erhaltener Integrität scharf dar. Die 28S ribosomale Bande ist etwa doppelt so groß wie die 18S Bande. Zur Testung der isolierten RNA auf Kontamination mit genomischer DNA nach DNase-Behandlung wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Bei guter RNA-Reinheit waren keine PCR-Produkte nachweisbar.

#### **3.1.2 Differentielle mRNA Expression durch Butyrat**

Bei 41 Faktoren im cDNA Expression Array zeigte sich mit Hilfe des Atlas Arrays Human 1.2 (Clontech) deutlich eine Modulation der Expression durch Butyrat (4mM). Die Expression von 22 Faktoren wurde vermindert und die von 21 Faktoren induziert.

<b>Faktoren</b>	<b>Position</b>
c-myc transcription factor PUF	A b9
c-myc	A c12
40S ribosomal protein S3A	A h9
PISSLRE	A i13
Xeroderma pigmentosum group C repair complementing	D a4
ERF-1	D j6
CAMP-dependent transcription factor ATF-4	E e2
Nuclease -sensitive element DNA-binding protein	E b4
40S ribosomal protein S19	A 17
Tyrosine-protein kinase receptor EPH	B d14
Glutathione peroxidase-gastrointestinal	F a6
HMGA	E f8
Integrin beta-4	E i11
Neuromedin-B receptor	E k3
Bone morphogenetic protein 4	F d1
M-CSF	F e3
Hepatoma-derived growth factor	F e5
VEGF	F f2
Interleukin-1 beta	F i10
Alpha-1-antitrypsin	F k5
Proteasome component C3	F 12
Monocyte Neutrophil elastase inhibitor	F 18

Tabelle 5: Faktoren, deren Expression durch Butyrat vermindert wurde.

<b>Faktoren</b>	<b>Position</b>
Cyclin K	A g13
Parathymosin	F j12
Interleukin-10 precursor IL-10	F j3
Glutathione S-transferase M1	F b13
Heat shock protein 86	F b4
Heat shock 27KD protein	F b5
Thioredoxin peroxidase 2 (TDPX2)	F a8
NKEFB	F a7
Glutathione S-transferase pi (GSTP1; GST3)	E n12
Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha subunit precursor	E i14
CDC28 protein kinase 1	A j14
MAP kinase-activated protein kinase 2	B h9
Tyrosine kinase TNK1	B k5
Neurogranin	C c6
Protein kinase C substrate	C e3
DAD-1	C k3
MutL protein homolog	C n6
p21	A k7
Basic transcription element-binding protein 2 (BTEB2)	D m9

Tabelle 6: Faktoren, deren Expression durch Butyrat induziert wurde.

### **3.2 Modulation der Expression von Proteinen durch Butyrat**

Eine mögliche Bestätigung der Butyratwirkung auf Proteinebene mittels Western Blot wurde mit Integrin-beta 4 als wichtigem Faktor der Kolonkarzinomentstehung im Bereich Zelladhäsion, mit Interleukin-1 beta als Entzündungsfaktor und HMGA als Transkriptionsfaktor bei den Kolonkarzinomzelllinien HT29, SW480 und deren Metastasenzelllinie SW620 nach Butyratinkubationszeiten von 12,24,48 und 72 Stunden untersucht.

#### **3.2.1 Modulation der Expression von Integrin-beta 4 durch Butyrat im Western Blot**

Butyrat verringerte ab einer Konzentration von 2mmol/l dosisabhängig ab einer Inkubationszeit von 48h die Expression von Integrin-beta 4 bei HT-29-, SW-480- und SW-620-Zellen (Abb. 1-3). Die Kontrolle mit der fünffachen Blocking-Peptid-Konzentration des Antikörpers zeigte erwartungsgemäß keine Integrin-beta 4-Bande bei 207kD.

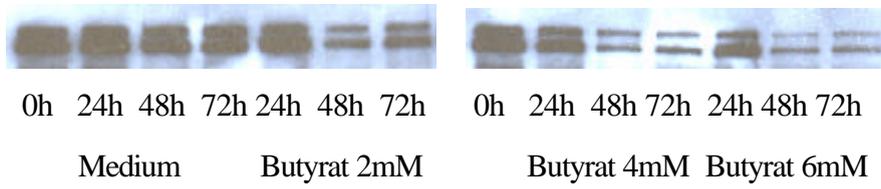


Abb. 1. Western Blot von Integrin-beta 4 in HT-29-Zellen nach Inkubation mit Butyrat.

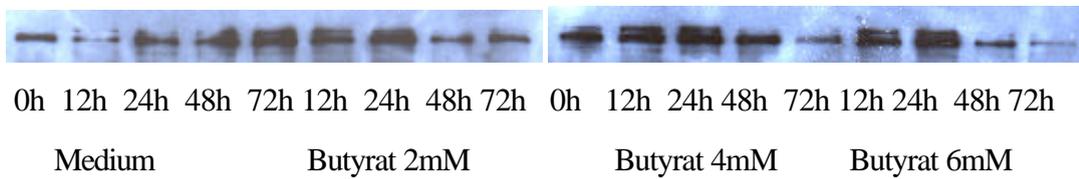


Abb. 2. Western Blot von Integrin-beta 4 in SW-480-Zellen nach Inkubation mit Butyrat.

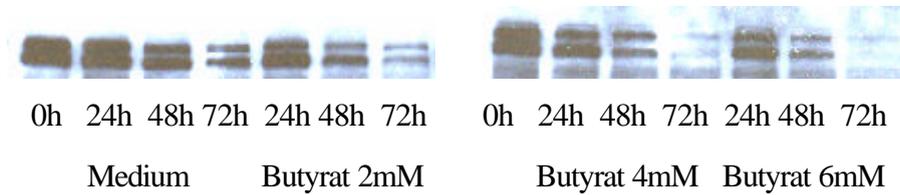


Abb. 3. Western Blot von Integrin-beta 4 in SW-620-Zellen nach Inkubation mit Butyrat.

### 3.2.2 Modulation der Expression von Interleukin-1 beta durch Butyrat im Western Blot

Butyrat verringerte ab einer Konzentration von 2mmol/l dosisunabhängig ab einer Inkubationszeit von 48 Stunden die Expression von Interleukin-1 beta bei HT-29-, SW-480- und SW-620-Zellen (Abb. 4-6).

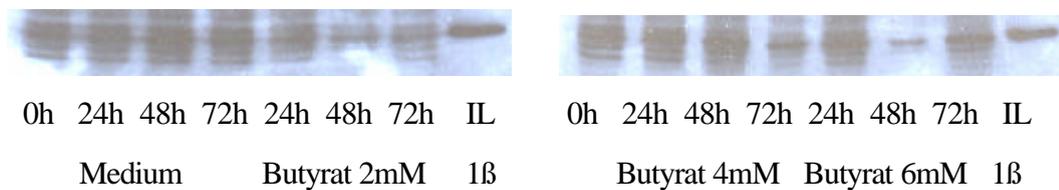


Abb. 4. Western Blot von Interleukin-1 beta in HT-29-Zellen nach Inkubation mit Butyrat

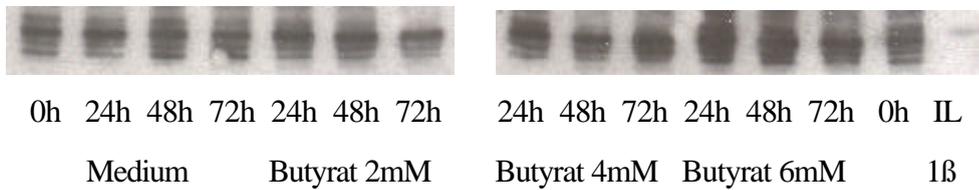


Abb. 5. Western Blot von Interleukin-1 beta in SW-480-Zellen nach Inkubation mit Butyrat

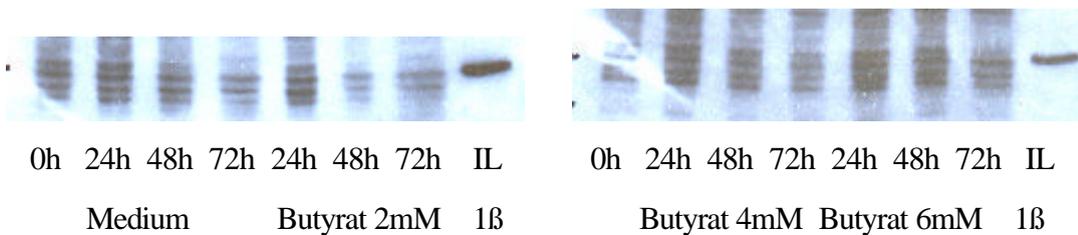


Abb. 6. Western Blot von Interleukin-1 beta in SW-620-Zellen nach Inkubation mit Butyrat

### 3.2.3 Modulation der Expression von HMGA durch Butyrat im Western Blot

Butyrat verringerte ab einer Konzentration von 6mmol/l ab einer Inkubationszeit von 48 Stunden die Expression von HMGA bei SW-620-Zellen.

Leider ließ sich dieses Ergebnis in Wiederholungsversuchen und mit anderen Zelllinien nicht eindeutig reproduzieren. Deshalb sollen weitere Versuche mit einem HMGA-Antikörper anderer Herkunft und eventuell dem entsprechenden „blocking peptide“ folgen.

In dieser Arbeit wurde die Modulation der Genexpression der Proteine Integrin-beta 4, Interleukin-1 beta und HMGA durch Butyrat-Inkubation von menschlichen HT-29-, SW-480- und SW-620-Kolonkarzinomzelllinien mittels Western Blot untersucht. Bereits früher konnte durch unsere Arbeitsgruppe eine Proliferationshemmung und eine Apoptose- und Differenzierungsinduktion von Kolonkarzinomzellen durch kurzkettige Fettsäuren gezeigt werden.

Als orientierende Untersuchung der Modulation der Genexpression diente ein cDNA Expression Array, mit dem in einem Untersuchungsansatz mehrere hundert Gene geprüft wurden.

Dabei zeigte sich unter anderem eine verminderte cDNA-Expression der Proteine Integrin-beta 4 (Zelladhäsionsfaktor), Interleukin-1 beta (Entzündungsfaktor) und HMGA (Transkriptionsfaktor) nach Inkubation von HT-29-Kolonkarzinomzellen mit Butyrat 4mmol/l über 24 Stunden im Gegensatz zu Medium. Mittels Western Blot, einer etablierten Labormethode, die pro Versuch nur ein Protein testen kann, wurde eine mögliche Modulation der Genexpression der genannten Proteine auch unter Inkubation mit den Butyratkonzentrationen 2, 4 und 6mmol/l nach 12, 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit untersucht. Neben der gutdifferenzierten HT-29- und der entdifferenzierten SW-480-Kolonadenokarzinomzelllinie wurde auch deren Metastasenzelllinie SW-620 getestet. Dabei zeigte sich eine Verringerung der Genexpression ab 48 Stunden Inkubationszeit mit 2mmol/l Butyrat.

## **4 Diskussion**

Integrin-beta 4 ist erforderlich für die Zelladhäsion, das Zellüberleben und die Hemidesmosomenbildung.

Nach de Arcangelis repräsentieren Laminine eine wachsende Familie von Glykoproteinen, die die Basalmembran bilden. Sie leiten viele biologische Prozesse. Unter Berücksichtigung der Karzinogenese spielen Laminine eine bedeutende Rolle in der Zell-Adhäsion, Mitogenese, Differenzierung und sogar bei Metastasen. Für weitere Studien der biologischen Signifikanz von Laminin-1 (zusammengesetzt aus alpha 1, beta 1 und gamma1-Ketten) bezüglich intestinaler Zelldifferenzierung und Tumorgenese, wurde ein alpha1-Laminin-Expressionsvektor in HT-29-Kolonkarzinomzellen eingeführt, in denen die alpha 1-Laminin-Kette nicht exprimiert wird. Auf die Transfektion der alpha 1-Laminin-Kette hin, wurde eine Sekretion des alpha 1-beta 1-gamma 1-Trimers in der Tunica media mit einer freien alpha 1-Kette mittels Immunpräzipitation gefunden. Die Anwesenheit der Laminin alpha-1-Kette modifizierte nicht signifikant den Spiegel der anderen Lamininketten oder der Integrine, die die HT-29-Zellen exprimieren. Trotz ähnlicher Wachstumseigenschaften der Kontrollzellen in vitro, zeigten die Laminin-alpha-1-Transfektanten einen signifikanten Anstieg des Tumorstadiums nach Injektion in Nacktmäuse. Die histologische und immunhistochemische Untersuchung der Laminin-alpha 1-exprimierenden Tumorzellen zeigte eine gestiegene Rekrutierung von Wirts-Bindegewebs- und Gefäßzellen ohne Modifikation in Differenzierungsprofil und Invasionspotential. Gleichzeitig traten eine klare Akkumulation von Laminin 10 (alpha 5-beta 1-gamma 1) an der Karzinom-/Bindegewebs-Berührungsfläche und eine Segregation der Integrin-beta 4-Untereinheit am basalen Pol der Karzinomzellen auf im Vergleich zu Kontrollzellen. Zusammenfassend zeigen die Beobachtungen die Bedeutung von Laminin 1 als einem chemischen Lockstoff für Bindegewebs- und Gefäßzellen und seine Bedeutung in den Epithel-/Bindegewebszell-Interaktionen für die Organisation der Basalmembran und der Segregation von Integrinen, die zu einem Epithelzellen-Wachstumssignal führt. Eine solche Reihenfolge von Ereignissen erinnert an die Vorgänge während der Entwicklung (78).

Laut Clarke erscheint die Fähigkeit des alpha 6beta 4-Integrins, als Laminin-Rezeptor zu funktionieren, Zelltyp-abhängig zu sein (hier bei Clone A-Zellen, einer menschlichen Kolonkarzinomzelllinie). Das Integrin funktioniert aber nicht in allen Zelltypen als ein Laminin-Rezeptor, in denen es exprimiert wird. Eine mögliche Art der alpha6-beta4-Regulation wohnt der beta 4-zytoplasmatischen Domäne inne, da strukturelle Varianten dieser Domäne existieren (79).

Nach Mohri induziert die Hochregulierung von Integrin alpha 6-beta 4 durch eine GTPase (Rac 1) eine Zelladhäsion und Membran-“Kräuselung“ nichtadhärenter Kolonkarzinom-Colo 201-Zellen mehr auf Lamininplatten als auf Kollagen- und Fibronectinplatten (80).

Rezniczek untersuchte die Verknüpfung der Integrin alpha 6-beta 4-basierten Zell-Adhäsion zu dem Intermediärfilamentzytoskelett. Es findet eine direkte Interaktion zwischen der beta 4-Untereinheit und Plectin an zahlreichen Bindungsstellen statt. Plectin stabilisiert Hemidesmosomen durch direkte Verknüpfung der beta 4-Untereinheit mit Zytokeratinfilamenten (82). Somit ist wohl eine direkte Interaktion von Integrin-beta 4 mit Laminin und Plectin zur Zelladhäsion vorhanden.

Nievers beschrieb dagegen oder zusätzlich eine Liganden-unabhängige Rolle der beta 4-Integrin-Untereinheit in der Formation von Hemidesmosomen. Die Anlage von Hemidesmosomen kann wohl von innerhalb der Zelle reguliert werden (81).

Sanvito erforschte die Expression des hoch konservierten Proteins p27BBP während der Progression des menschlichen kolorektalen Karzinoms. p27BBP ist ein zytoplasmatischer Interakteur von Integrin-beta 4, der in Epithelien exprimiert ist. Er kommt im perinukleären und im zytoplasmatischen Pool vor. Das Protein tritt vermehrt in Zellen mit schnellem Zellzyklus auf, vermindert in villösen Zellen vor der Apoptose. Dysplastische Adenome und Karzinome enthalten dieses Protein als nukleäre Komponente, assoziiert mit der nukleären Matrix, bestätigt durch einen Western Blot.

Es ist erhöht in der Progression vom Adenom zum Karzinom und Tumor-Stadien-abhängig. Die Überexpression korrespondiert zu einer mRNA-Hochregulation beim Karzinom, die einer transkriptionellen bzw. posttranskriptionellen Regulationsänderung entspricht. Es handelt sich um ein frühes Ereignis im Übergang zu malignen Formen. Damit könnte p27BBP in der chirurgischen Pathologie als diagnostischer Marker dienen (83).

Daemi berichtet, daß Anti-beta 4-Integrin-Antikörper die Migration und Invasivität von menschlichen Kolon-LoVo-Adenokarzinomzellen bei immunsupprimierten, neugeborenen Ratten erhöhen (84), entsprechend den Ergebnissen von Sanvito.

Basora untersuchte die Expression von funktionell verschiedenen Varianten der beta 4 A Integrin-Untereinheit in Bezug zum Differenzierungsgrad menschlicher Darmzellen. Integrine sind wichtige Mediatoren der Zell-Laminin-Interaktionen. Eine Reevaluation der Expression der beta 4-Untereinheit mit verschiedenen Antikörpern zeigte, daß 2 Formen von beta 4 existieren im menschlichen Darmepithel. Differenzierte Enterozyten exprimieren eine normal lange 205-kD beta 4-Untereinheit, wohingegen undifferenzierte Kryptenzellen eine neuartige beta 4-Untereinheit exprimieren ohne das COOH-Endsegment der zytoplasmatischen Domäne (beta 4 A(ctd-)). Beide Formen können alpha 6-beta 4 A-Komplexe bilden. Jedoch kann das beta 4 A (ctd-)-Integrin der undifferenzierten Zellen keine funktionelle Adhäsion mit Laminin-5 bilden (85).

Da viele Integrin-beta 4-Antikörper, wie in dieser Arbeit, an das COOH-Endsegment binden, wird die neuartige oder mutierte beta 4-Untereinheit nicht erkannt, vom Antikörper nicht gebunden und mit einer Verminderung der Integrin-beta 4-Expression in Verbindung gebracht. Murgia sah Zellzyklus- und Adhäsionsdefekte bei Mäusen mit einer gezielten Deletion der zytoplasmatischen Integrin-beta 4-Domäne. Die Interaktionen, die durch das beta 4-Ende vermittelt werden, sind wichtig für eine stabile Adhäsion mehrschichtigen Epithels an die Basalmembran und für eine ordentliche Zellzykluskontrolle in den proliferierenden Kompartimenten von mehr- und einschichtigem Epithel (86).

Suzuki stellte eine reduzierte Substratum-Adhäsion und verminderte Expression von 1- und 4-Integrinen bei menschlichen Brustkrebszellen mit der Eigenschaft von verankerungsunabhängigem Wachstum fest (87).

Eine Reduktion von Integrin-beta 4 und verstärkte Migration an Laminin wurde im Zusammenhang mit intraepithelialer Ausbreitung von Blasenkarzinomen gesehen (88).

Ramarli berichtet, daß Thymozytenkontakt- oder monoklonale Antikörper-vermittelte Gruppierung von 3 beta 1- oder 6 beta 4-Integrinen Interleukin-6-Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B und NF-IL6) und IL-6-Produktion in menschlichen Thymuszellen aktivieren (89).

Bei Prostatakarzinomen und prostatistischen intraepithelialen Neoplasien fand Allen eine Abregulierung der beta 4-Untereinheit im Vergleich zu benignem Prostataepithel. Dies dürfte mit der neoplastischen Transformation der Prostata und dem Verlust von Hemidesmosomen oder basaler epithelialer Zellen korrelieren (90).

Auch im Bereich nichtkarzinomatöser pathologischer Veränderungen ist Integrin-beta 4 involviert. So zeigt zum Beispiel Inoue eine Missense-Mutation im zytoplasmatischen Ende von beta 4-Integrin (G 931 D), die die hemidesmosomale Anlagerung unterbricht und einer Non-Herlitz-junktionalen Epidermolysis bullosa ohne Pylorusatresie zugrundeliegt (77).

Kambham berichtet von der Assoziation der kongenitalen, fokal segmentalen Glomerusklerose mit beta-4-Integrin-Mutation und Epidermolysis bullosa (76).

Clarke beschreibt die Aktivierung des p21-Pfades von Wachstumshemmung, Differenzierung und Apoptose durch die zytoplasmatische beta 4-Integrin-Domäne (91). Eine interessante Komponente, die aber wohl in den Integrin-beta 4-Wirkungen nicht überwiegt.

Unsere Arbeiten zum Integrin- $\beta$ 4 zeigen, daß die Inkubation mit Butyrat zu einer Verringerung der Integrin- $\beta$ 4-Spiegel führt. In Anbetracht der aufgeführten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen interpretieren wir unsere Ergebnisse wie folgt: Butyrat verringert die Zelladhäsion und damit die Progression und das metastatische Potential kolorektaler Karzinome.

Interleukin-1 beta spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort und der Entzündung.

Der Interleukin-1 beta-induzierte NF $\kappa$ B-Signalpfad zur erhöhten Transkription antiapoptotischer Faktoren in Kolonkarzinomzellen wird nach Jin durch Thalidomid unterdrückt. Es wurde die Transkriptionsaktivierung von NF $\kappa$ B und die Interleukin-8-Produktion in CaCo-2-Kolonkarzinomzellen verhindert. Zusätzlich unterdrückte Thalidomid die nukleäre Translokation von NF $\kappa$ B, den I $\kappa$ B-Abbau und die durch die NF $\kappa$ B-induzierende Kinase (NIK)-induzierte NF $\kappa$ B Transkriptionsaktivierung. Das molekulare Ziel der Effekte von Thalidomid ist wohl die I $\kappa$ B-Phosphorylierung durch die I $\kappa$ B-Kinase (I $\kappa$ K), deren Aktivierung die NIK-Aktivierung folgt und der der I $\kappa$ B-Abbau im NF $\kappa$ B-Pfad vorausgeht (99).

Unsere Arbeitsgruppe konnte eine Butyrat-vermittelte Inhibition der NF $\kappa$ B-Aktivierung (111) sowie die Inhibition des Zytokin-aktivierten Abbaus des inhibitorischen  $\kappa$ B-Proteins durch Butyrat zeigen (116).

Gan berichtet über die signifikant gestiegene Interleukin-1 beta-mRNA und Interleukin-8-mRNA bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es bestand eine signifikante positive Korrelation mit der NF $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität. Glucocorticoide und Sulfasalazin unterdrückten heftig die NF $\kappa$ B-Aktivierung und verminderten signifikant die Expression von Interleukin-1 beta-mRNA und Interleukin-8-mRNA (100).

Auch die Behandlung der Colitis ulcerosa mit Butyrat wurde in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet. Die topische Anwendung von Butyrat bei Patienten mit Colitis ulcerosa führte dabei zu einer Abschwächung der Krankheitsaktivität (117).

Inan berichtet, daß der Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) Gene reguliert, die die Zellproliferation, Apoptose und inflammatorische Antwort beeinflussen können. Da diese Ereignisse zur Karzinogenese beitragen können, wurde die Expression von NF $\kappa$ B-inhibitorischen Proteinen (I $\kappa$ B) in normalen und in transformierten (HT-29)-Kolonepithelzellen untersucht. Spezielle I $\kappa$ B-beta-Unterform-Proteine (p106 und p112) banden an NF $\kappa$ B und ihre Spiegel änderten sich während der Interleukin-1 beta-Aktivierung von NF $\kappa$ B in den HT-29-Zellen. Mängel im proteasomalen Abbau von I $\kappa$ B-beta führen wohl zur Ansammlung von p 106 und p 112, das wiederum die NF $\kappa$ B-Regulation in Kolonkarzinomzellen ändert (101).

Simiantonaki untersuchte den Effekt proinflammatorischer Stimuli (Lipopolysaccharide, TNFalpha und Interleukin-1 beta) auf die Tumorzell-vermittelte (z.B.: HT-29, SW620) Induktion von Endothelzelladhäsionsmolekülen (HUVEC) in vitro. Dabei induzierten vor allem bakterielle Lipopolysaccharide, wie sie im Darmlumen vorkommen, nicht aber Interleukin-1 beta, endotheliale Zelladhäsionsmoleküle (CAM) und erhöhten damit das metastatische Potential (102).

Minami erforschte die Rolle des carcinoembryonalen Antigens (CEA) in der Progression des Kolonkarzinoms. CEA fördert das metastatische Potential in einigen experimentellen Tumoren. Adhäsionsmoleküle spielen dabei eine große Rolle. Zytokine, einschließlich Interleukin-1 beta und Tumornekrosefaktor alpha, die von Kupffer-Zellen der Leber produziert werden, induzieren Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen. Es wurde ein

Adhäsionsversuch von Kolonkarzinomzelllinien an menschliche Nabelvenen-Endothel-Zellen (HUVEC) durchgeführt. Als CEA dem Kupffer-Zell-Kultur-Medium hinzugefügt wurde, wurden Zytokine produziert. Erhöhte Zytokinspiegel führten zu vermehrten Adhäsionsraten von Karzinomzellen an Endothelzellen. Diese Prozesse tragen wohl zu Lebermetastasen bei. Dieses Phänomen wurde durch Hinzufügen von Zytokininhibitoren blockiert. Somit könnten diese Inhibitoren eine bedeutende Rolle in der Verhinderung von Lebermetastasen spielen (103).

Yoshida untersuchte den Effekt von Scherkräftestreß und einem stabilen Prostaglandin I<sub>2</sub>-Analogon auf Adhäsionsinteraktionen zwischen Kolonkarzinomzellen und Endothelzellen. Menschliche Kolonkarzinomzellen der Linie Colo 201 gingen Adhäsionen ein mit Interleukin-1 beta -stimulierten Endothelzellen (HUVEC) über Sialyl Lewis a (Slea) und ESelectin bei niedrigen Flußbedingungen. Prostaglandin I<sub>2</sub>-Analoga dürften gegen Metastasierung durch Inhibition von Karzinomzell-Endothelzell-Interaktionen schützen (104).

Matsushita fand heraus, daß Selectine, induziert durch Interleukin-1 beta, an menschlichen Leberendothelzellen als Liganden für Sialyl Lewis X-exprimierende menschliche Kolonkarzinomzellen agieren (105).

Sawada sah eine differentielle E-Selectin-abhängige Adhäsionseffektivität in Unterlinien eines menschlichen Kolonkarzinoms, das verschiedene metastatische Potentiale darstellt. Auch hochmetastasierende Zellen adhärten effektiver an Mausendothelzellen nach Aktivierung mit Interleukin-1 beta. In einer Phase I-Studie von rekombinatem, menschlichem Interleukin alleine und in Kombination mit myelosuppressiven Dosen von 5-FU bei Patienten mit gastrointestinalem Karzinom hatte Interleukin stimulierende Effekte auf die menschliche Hämatopoese (106).

Koschiji erforschte die Mechanismen, die der Apoptoseinduktion durch eine Kombination von 5-Fluorouracil (5-FU) und Interferon gamma (IFN gamma) zugrundeliegen. Die Apoptose korrelierte mit einer Erniedrigung von Bcl-2 und einer Erhöhung von Bax und wurde sowohl durch 5-FU alleine als auch durch die Kombination induziert. Ein Interleukin-1 beta-Konversionsenzym (ICE) -ähnlicher Proteaseinhibitor (aber nicht ein ICE-Inhibitor) blockierte die Apoptose, die nur durch 5-FU induziert war. Das Apoptose-induzierende Signal von 5-FU scheint verschieden von dem von Interferon gamma zu sein und die Effekte addieren sich.

Diese Feststellungen stellen eine experimentelle Basis für eine klinische Therapie mit 5-FU und/oder IFN gamma bei kolorektalem Karzinom dar (107).

Van Rossen berichtet darüber, daß das inflammatorische Zytokin Interleukin-1 beta und der epidermale Wachstumsfaktor signifikante vorantreibende Faktoren in der Tumorzell-Adhäsion zum Mesothelium in vitro sind. Sie dürften deshalb zu Tumorrezidiven im Peritoneum beitragen (108).

Tran-Thang beschrieb die Modulation des Plasminogen-aktivierenden Systems durch inflammatorische Zytokine in menschlichen Kolonkarzinomzellen. Eine Entzündung dürfte eine maligne Invasion durch eine Erhöhung der Karzinomzell-assoziierten Proteolyse fördern. Tumornekrosefaktor alpha und Interleukin-1 beta stimulieren das Plasminogen-aktivierende System in Tumorzellen, aber die Antworten waren sogar in Zellen vom gleichen Gewebsursprung verschieden (109).

Laut Deng wird durch Interleukin-1 beta, TNF alpha und Lipopolysaccharide der Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Proteinspiegel erhöht. Das Cyclooxygenase-2-Enzym spielt eine bedeutende Rolle in verschiedenen pathophysiologischen Prozessen einschließlich Entzündung, Angiogenese und Tumorentstehung (110).

Prostaglandine erhöhten nach Bamba die Produktion von vasculärem, endothelialem Wachstumsfaktor (VEGF) durch aktivierte Makrophagen (Indikator Interleukin-1 beta) durch spezifische Prostaglandin-Rezeptor und Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) vermittelte Prozesse. Prostaglandine dürften hierbei Tumorwachstum durch VEGF-Produktion fördern (112), wobei nach Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe Butyrat die VEGF-Expression vermindert (127) und PPAR $\gamma$  vermehrt exprimiert (128).

Ota untersuchte die Expression des Hepatozyten-Wachstumsfaktors bei Kolonkarzinomen. Prostaglandine erhöhten dessen Produktion signifikant Dosis- und Zeit-abhängig. Interleukin-1 beta steigerte dramatisch die Prostaglandin E 2-Produktion und stimulierte signifikant die Synthese des Hepatozytenwachstumsfaktors. Interleukin-1 beta induzierte das Cyclooxygenase-2-, aber nicht das Cyclooxygenase -1-Protein. Indomethacin reduzierte signifikant die Interleukin-1 beta-induzierte Prostaglandin E 2-Freisetzung und die Hepatozytenwachstumsfaktorproduktion. Nichtsteroidale Antiphlogistika dürften die Kolonkarzinogenese teilweise durch die Unterdrückung der

Hepatozytenwachstumsfaktorexpression aufgrund verminderter endogener Prostaglandinproduktion einschränken (113).

Calatayud beschrieb die Beziehung zwischen endogenen Kolonie-stimulierenden Faktoren (GM-CSF, G-CSF und M-CSF) und Apoptose in menschlichen Kolonkarzinomzellen (HT-29) unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Cyclooxygenaseinhibitoren. Nichtsteroidale Antiphlogistika führen zu gastrointestinalen Entzündungen und erschweren die entzündlichen Bedingungen im Darm. Andererseits haben sie eine präventive Wirkung gegen das Kolonkarzinom, die wohl mit der erhöhten Kolonzellapoptose zusammenhängt. HT-29-Zellen sezernierten bioaktive Spiegel von GM-CSF, G-CSF und M-CSF nach Stimulation mit Interleukin-1 $\alpha$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ . Diclofenac, Indomethacin und Natriumsalicylat induzierten konzentrationsabhängige Anstiege in der GM-CSF-Sekretion. Reduzierte Sekretion von G-CSF und M-CSF und erhöhte Zellapoptose wurden mit den höchsten Konzentrationen dieser nicht-selektiven nichtsteroidalen Antiphlogistika beobachtet. Weder die endogene Zufuhr von Kolonie-stimulierenden Faktoren noch die Blockade der sezernierten Faktoren modifizierten die Apoptose von HT-29-Zellen, die mit Zytokinen und/oder nichtsteroidalen Antiphlogistika stimuliert waren. Somit können Kolonepithelzellen zu lokalen entzündlichen Antworten durch die Freisetzung von Kolonie-stimulierenden Faktoren beitragen und die Lebenszeit örtlicher Leukozyten verlängern. Die Modulation der Faktorspiegel durch nicht-selektive, nichtsteroidale Antiphlogistika dürfte in die proinflammatorischen Effekte dieser Mittel im Darm verwickelt sein (114).

Colombo berichtet über den hypoxischen Tumorzelltod und die Modulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle in der Regression von Tumoren, die durch Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren (G-CSF) verändert sind. C-26 Adenokarzinomzellen kombiniert mit G-CSF verursachen große Tumoren in subletal bestrahlten Mäusen. Bei wiederhergestellter Leukozytenfunktion schrumpft der Tumor hypoxisch durch Tumorgefäßverlust. Es tritt eine Basalmembranzerstörung, eine Zellschwellung und ein Verbindungsverlust der Tumorgefäße abhängig von Leukozyteninfiltration und Zytokinen ein. Lokal produziertes Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  induzierten das vaskuläre zelluläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und E-Selectin an Tumorgefäßen. Nach Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen Interferon gamma und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  wurde die Tumorregression durch fehlende

Induktion durch Zytokine blockiert und es konnten weniger infiltrierende Leukozyten vor Ort kommen (115).

Die Interleukin-8-Genexpression in CaCo-2-Zellen wird durch Verbindungen inhibiert, die eine Histonhyperazetylierung induzieren. Die Colitis ulcerosa kann durch kurzkettige Fettsäuren in Form von Einläufen effektiv behandelt werden. Die intestinale Entzündung führt zu einer Epitheldifferenzierung mit erhöhter Proliferation und Entdifferenzierung, was durch Butyrat inhibiert werden kann. Die Kombination von proinflammatorischem Zytokin Interleukin-8 und kurzkettigen Fettsäuren oder Trichostatin, beide Histonhyperazetylierer, führten nach Huang dosisabhängig zu einer CaCo 2-Zelldifferenzierung und inhibierten Interleukin-8. So kommt es durch die effektive Behandlung der Colitis ulcerosa mit kurzkettigen Fettsäuren zu einer Histonhyperazetylierung und zur Verminderung proinflammatorischer Substanzen (118).

Auch Nicht-Histon-Proteine wie HMGN2 werden durch kurzkettige Fettsäuren hyperacetyliert, wie dies unsere Arbeitsgruppe anhand von Butyrat zeigen konnte (129).

Onier hat die Expression von induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase in Tumoren bezüglich ihrer Regression, induziert durch Lipid A, bei Ratten untersucht. Stickstoffmonoxid ist ein Effektor-Molekül der Makrophagen-vermittelten Tumorzelltoxizität in vitro. Lipid A hat keinen direkten Effekt auf Tumorzellen in vitro. Im Gegensatz dazu induzierte die Kombination von Interferon gamma und Interleukin-1 beta die Produktion von Stickstoffmonoxid durch Tumorzellen in zytostatischer Dosis. Während der Lipid A-Behandlung war diese Dosis in den Tumoren weiter erhöht. Das passt zu einem indirekten Effekt von Lipid A in vivo über den Interferon gamma- und Interleukin-1 beta-Pfad (119).

Ursodesoxycholsäure (UDCA) inhibiert die Induktion von Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) in menschlichen intestinalen Epithelzellen und in vivo. UDCA hat antiinflammatorische und chemoprotektive Effekte in Tiermodellen von entzündlichen Darmerkrankungen und Kolonkarzinom. In transformierten menschlichen Darmepithelzellen (DLD-1) wurde eine dosisabhängige Inhibition von Interleukin-1 beta- und Interferon gamma-stimulierter Nitrit/Nitrat-Produktion bei einer Inkubation mit UDCA entdeckt (120). Somit könnte UDCA die Tumorregression behindern.

Jarry stellte fest, daß das Interleukin-1- und das Interleukin-1 beta-Konversionsenzym (Caspase 1) in der menschlichen Kolonepithel-Barriere exprimiert wird. Caspase 1 ist in proapoptotischen Signalwegen involviert. Interleukin-1 beta wurde in nahezu allen menschlichen Kolonocyten gefunden (92%). Das normale Epithel exprimiert kräftig Caspase 1, auf der mRNA-Stufe und der Protein-Stufe in seiner latenten Form. Caspase 1 wurde in primären Kolonadenokarzinomen und Kolonkarzinomzelllinien nicht exprimiert. Unter bestimmten Bedingungen könnte das normale Kolonepithel eine inflammatorische Reaktion auslösen. Die Verminderung von Caspase 1 in Kolonadenokarzinomen unerstützt das Konzept, daß unterbrochene Apoptosepfade in die Tumorbildung involviert sein könnten und/oder einer Behandlung Widerstand entgegenbringen könnten (121).

Bjorge charakterisierte die Komplement-regulierenden Proteine decay-accelerating-factor (DAF, CD 55) und Membran-Cofaktor-Protein (MCP, CD 46) in einer menschlichen Kolonadenokarzinomzelllinie (HT-29). Um Zerstörung durch Komplement zu vermeiden, exprimieren normale und maligne Zellen Membranglykoproteine, die die Komplementaktivität begrenzen (z.B.: DAF, MCP). DAF wird hochreguliert durch Tumornekrosefaktor alpha und Interleukin-1 beta, nicht aber durch Interferon gamma. MCP wird erhöht exprimiert durch Interleukin-1 beta-Stimulation. Dies sind mögliche Mechanismen des Tumors, zu überleben (122).

Nach Koch moduliert Interleukin-1 das Wachstum einer Subgruppe menschlicher Nierenkarzinomzellen über den Interleukin-1-Rezeptor. Daher stellt eine Interferenz mit seinem Aktionsmechanismus eine Möglichkeit dar, die Tumorphroliferation zu modulieren (123).

Leung untersuchte die systemische Zytokin-Antwort nach laparoskopischer Resektion von rektosigmoidalen Karzinomen im Vergleich zu offener Resektion. Dabei hatten die Zytokine Interleukin-1 beta und Interleukin-6 ihren Gipfelwert nach 2 Stunden, C-reaktives Protein nach 48 Stunden. Der Tumornekrosefaktor-alpha erhöhte sich nicht. Die Werte lagen in der laparoskopischen Gruppe signifikant niedriger. Der Unterschied in der Zytokin-Antwort dürfte Einfluß auf das Langzeitüberleben haben (124).

Cafferata stellte fest, daß Interleukin-1 beta die CFTR-Expression (mRNA und Protein), wichtig für die Bildung von Chloridionenkanälen und mutiert bei cystischer Fibrose (CF), in menschlichen intestinalen Zellen T 84 hochreguliert. Bei mehr als 1ng/ml trat Inhibition ein. Die

Proteinkinase(PKC)inhibitoren H 7 und GF 109203X inhibierten den stimulatorischen Effekt von Interleukin-1 beta. Ähnlich war die Wirkung der Protein- Tyrosinkinase(PTK)inhibitoren genistein und herbymicin (Cycloheximid ähnlich). Interleukin-1 beta ist das erste extrazelluläre bekannte Protein, das die CFTR-Genexpression hochreguliert (125) und könnte damit vielleicht in der Behandlung der cystischen Fibrose eingesetzt werden.

Nach Untersuchungen von Lahav inhibiert Lidocain die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-8 und Interleukin-1 beta in HT-29 und CaCo 2-Zellen. Es stimuliert außerdem die Sekretion eines Interleukin -1 Rezeptorantagonisten durch Epithelzellen (126). Bei ähnlicher Wirkung hat aber Butyrat sicher weniger Nebenwirkungen.

Unsere Untersuchungen zeigen eine Verringerung der Expression von Interleukin-1 beta in Kolonkarzinomzellen nach Inkubation mit Butyrat. In Anbetracht der vorgestellten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen lassen sich unsere Ergebnisse wie folgt interpretieren: Butyrat vermindert Entzündung, Tumor- und Metastasenentstehung.

HMGA erleichtert zahlreiche DNA-bezogene Aktivitäten wie Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur durch Veränderung der DNA-Struktur und Organisation der Chromatinfasern.

HMGA-Proteine sind wichtige Strukturelemente der Metaphasechromosomen (41). In der Tat blockiert die Expression eines synthetischen Proteins, das viele AT- Haken enthält, die Anlage mitotischer Chromosomen. Ebenso dürfte HMGA die H1-vermittelte generelle Repression der Transkription antagonisieren, indem es das Histon H1 von Gerüst-assoziierten Regionen entfernt (42). Durch die Interferenz mit der Bindung von Homoeodomän-Proteinen dürften sie die Embryonalentwicklung affizieren (43). Die HMGA-Proteine funktionieren auch als generelle Wirtsfaktoren für die Bildung des HIV-Virus Typ1 und Moloney-Maus-Leukämie-Virus-Vorintegrationskomplexe (44,45).Zusätzlich modulieren die HMGA-Proteine die Expression spezifischer Gene sowie die induzierbare Form der Stickstoffoxid Synthase (46), Tumornekrosefaktor beta (TNF- $\beta$ ), IFN- $\beta$ , Interleukin-2-Rezeptor, E-Selectin, Interleukin-4, humanes GP 91-PHOX, E-Immunglobulin G (47) und T-Zell Rezeptor alpha (48).

In verschiedenen Fällen sind die Effekte von HMGA synergistisch mit denen von NF- $\kappa$ B (49,50) und anderen Regulationsfaktoren. Die Konformationsänderungen durch HMGA an spezifischen DNA-Sequenzen dürften die Anlage von Repressoren oder Aktivatoren naher Regulatorregionen fördern. Das betrifft spezifische Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktionen. Zum Beispiel verstärkt HMGA die Aktivität von SRF (Serumresponsefaktor) durch Interaktion direkt mit SRF mehr als durch Konformationsänderung der DNA (51). Das bestuntersuchte Beispiel des Effekts von HMGA auf Genexpression wird durch den Virus-induzierbaren Verstärker von IFN- $\beta$  geliefert. Die Bindung von HMGA an spezifische positive DNA-Regulator-Elemente führt zu DNA-Streckung, Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, ATF2/c-Jun und IRF-1 und die Bildung einer stabilen Nukleoprotein-Struktur, genannt der „Enhanceosome“ (52). Seine Bildung ist sowohl abhängig von der DNA-Streckung als auch von spezifischen Kontakten zwischen HMGA und den Transkriptionsfaktoren. Die doppelte Rolle des HMGA-Proteins in der Anlage des Enhanceosomes und in der IFN- $\beta$ -Genexpression wurde dadurch demonstriert, daß die spezifische Azetylierung von HMGA durch CBP, aber nicht durch PCAF, den Enhanceosome demontiert und die IFN- $\beta$ -Genexpression abschaltet (53). HMGA-Proteine werden vorzugsweise in der frühen Entwicklung exprimiert. Dysregulation ihrer Expression ist mit einer Alteration in Zellwachstum und -differenzierung verbunden (47,54,55,56). Die Korrelation zwischen Rearrangement in der chromosomalen Region, die das HMGA-Gen enthält, und sehr häufigen, benignen, mesenchymalen Tumoren wie Lipomen, Uterusleiomyomen und Endometriumpolypen ist auffällig (59,60-63,56). In einigen Fällen binden diese Translokationen den AT-Haken an neue Transkriptions-regulierende Domänen, was zu DNA-Mißinsertion (einer Nukleotidsequenz) führt (59). Auch wenn es unklar ist, ob das Rearrangement im HMGA-Gen ein Primär oder Sekundärereignis in der Ätiologie dieser benignen Tumoren ist, wird es allgemein akzeptiert, daß die erhöhte Expression dieser Gene ein wichtiger Faktor in diesem Prozeß ist (63,64). Die weitverbreitete Beteiligung des AT-Haken-Motivs an vielen Karzinomtypen macht dieses Motiv und seine Bindungsstelle zu einem potentiellen Ziel für Antikrebsmedikamente (58,33). HMGB und HMGA konkurrieren untereinander und mit dem Histon H1 um die Bindung an verschiedene, deformierte DNA-Strukturen wie Vier-Wege-

Bindungen oder Cisplatin-modifizierte DNA (65,66) und HMGA konkurriert mit H1 um die Bindung an AT-reiche, nukleäre Matricelemente (42).

Abe et al. untersuchten, ob die Bestimmung der HMGA-Expressionsspiegel bei der Differentialdiagnose zwischen kolorektalem Karzinom, Adenom und normalem Gewebe und der Bestimmung der Prognose der Patienten mit kolorektalem Karzinom helfen könnten. Es wurden sowohl Protein- als auch mRNA-Spiegel bei 30 kolorektalen Karzinomen, 26 Adenomen und 23 normalen Kolonschleimhautepithelien bestimmt. Weiterhin wurden Korrelationen zwischen den Protein-Expressionsspiegeln und verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern, wie Tumorinvasionstiefe, lymphatische und (oder) venöse Beteiligung, regionale Lymphknotenmetastasen untersucht und ein Staging nach der Duke-Klassifikation bei den 30 Karzinomfällen durchgeführt. Die Expression der HMGA-Proteine war signifikant erhöht bei den Karzinomen und Adenomen mit schweren Atypien im Vergleich zu den Adenomen mit geringen Atypien und der normalen kolorektalen Schleimhaut. Dieser Anstieg der HMGA-Proteinexpression existierte aufgrund eines Anstiegs seiner mRNA-Expression, untersucht mittels einer in Situ-Hybridisierungsanalyse. Die klinisch-pathologische Analyse zeigte, daß der Spiegel der HMGA-Protein-Expression signifikant korrelierte mit Parametern, die bekanntermaßen eine schlechte Prognose bei Patienten mit kolorektalem Karzinom anzeigen. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte der HMGA-Protein-Spiegel ein potentieller Marker für die Diagnose kolorektaler Neoplasien sein und die Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom vorhersagen (67).

Auch Kim et al. analysierten die HMGA-Expression bei kolorektalen Karzinomen und evaluierten seine klinische pathologische Signifikanz. HMGA-mRNA wurde mit CRT-PCR (kompetitive Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion) gemessen. Es wurde eine immunhistochemische Färbung von HMGA, p 53 und Ki-67 in den selben Kolonkarzinomgeweben durchgeführt. Die Ergebnisse waren der RT-PCR ähnlich. HMGA-Expression mittels RT-PCR wurde in 63 von 64 (98,4%) der kolorektalen Karzinomproben entdeckt und in 2 von 5 (40%) adenomatösen Polypen, wohingegen 21 normale Kolonproben negativ waren ( $p < 0,001$ ). Es gab im Gegensatz zu Abe et al. keine signifikante Korrelation zwischen den Spiegeln der HMGA-Expression und dem Stadium, Tumorsitz, Lymphknotenmetastasen, histologischem Grad und immunhistochemischem Status von p 53.

Die Erklärung sah Kim et al. darin, daß die Expression von HMGA in einem frühen Stadium der Karzinogenese auftritt und mit der Zellproliferation korreliert (68).

Chiappetta et al. analysierten die Expression von HMGA-Proteinen in hyperplastischen, präneoplastischen und neoplastischen Geweben kolorektalen Ursprungs mittels Immunhistochemie, um festzustellen, auf welcher Stufe des karzinogenen Prozesses HMGA-Induktion auftritt. Alle kolorektalen Karzinome waren HMGA positiv, im Gegensatz zu normalem Kolonschleimhautgewebe. Die HMGA-Expression bei Adenomen korrelierte streng mit dem Zellatypiegrad. Nur 2 der 18 getesteten, nichtneoplastischen Polypen waren HMGA-positiv. Somit ist HMGA-Protein-Induktion assoziiert mit den frühen Stadien neoplastischer Transformation von Kolonzellen und nur selten mit Kolonzellhyperproliferation (69).

Fedele et al. haben gezeigt, daß die HMGA-Genexpression vorhanden ist in der RNA und im Proteinspiegel in menschlichen kolorektalen Karzinomzelllinien und Geweben, die in dieser Studie untersucht wurden. Im Gegensatz dazu wurden keine HMGA-Proteine in normaler intestinaler Schleimhaut entdeckt. Deshalb liegt wohl eine Beteiligung von HMGA-Protein-Überexpression bei der kolorektalen Tumorgenese vor.

Unsere Arbeitsgruppe konnte eine Verminderung der HMGA-Expression durch Butyratinkubation im Northern-Blot nachweisen (130).

HMGA-Proteine sind außerdem in Prostata- und Schilddrüsenkarzinomen (69) sowie in Lungen-, Brust- und Hautkarzinomen überexprimiert (70).

Die verminderten HMGA-Spiegel nach Inkubation mit Butyrat deuten auf eine erniedrigte Transkriptionsrate kolorektaler Karzinomzellen hin.

Nach den übereinstimmenden Literaturangaben bezüglich der Invasivität kolorektaler Karzinome wäre ein qualitativer Unterschied der Expression der Proteine Integrin-beta 4, und HMGA in den verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien zu erwarten gewesen. Aber zumindest in vitro waren hier keine verminderten Proteinexpressionen in der undifferenzierten SW480- bzw. deren Metastasenzelllinie SW620 im Gegensatz zur gut differenzierten HT-29 Kolonadenokarzinomzelllinie zu sehen.

Wie oben ausführlich beschrieben, könnten Integrin-beta 4 und HMGA als diagnostische und prognostische Marker für kolorektale Karzinome dienen. Nahezu alle bisher bekannten

Butyrat-Wirkungspfade wie NFκB, p21, Hyperacetylierung, PPARγ und ras spielen eine Rolle in der Modulation der Expression des Zelladhäsionsfaktors Integrin beta- 4, des Entzündungsfaktors Interleukin-1 beta und des Transkriptionsfaktors HMGA. Damit gibt es in wichtigen Bereichen der Tumorgenese auf Proteinebene weitere Erklärungsmöglichkeiten der Wirkungsweise der Butyrat-vermittelten Tumorprävention und Tumorregression.

## 5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist derzeit in der westlichen Welt das zweithäufigste Karzinom. Neben den erblichen Ursachen ist die Inzidenz durch fettreiche, fleischreiche und ballaststoffarme Kost erhöht. Protektive Faktoren sind ballaststoffreiche Ernährung mit regelmäßigem Obst- und Gemüseverzehr.

Bei der Fermentation der Ballaststoffe entstehen kurzkettige Fettsäuren. Im Vordergrund steht dabei Butyrat.

In dieser Arbeit wurde die Modulation der Genexpression der Proteine Integrin-beta 4, Interleukin-1 beta und HMGA durch Butyrat-Inkubation (2,4,6mmol/l über 12,24,48,72 Stunden) von menschlichen, gut differenzierten HT-29-, entdifferenzierten SW-480- und deren Metastasen-SW-620-Kolonadenokarzinomzelllinien mittels Western Blot untersucht.

Dabei zeigte sich jeweils (bei HMGA nicht eindeutig) eine Verringerung der Genexpression ab 48 Stunden Inkubationszeit ab einer Konzentration von 2mmol/l Butyrat.

Integrin beta-4 ist erforderlich für Zelladhäsion, Zellüberleben und die Hemidesmosomenbildung. Außen besteht eine Befestigung an den Liganden Laminin, ein Basalmembranglykoprotein, innen an das Keratinzytoskelett über Plectin. Integrin-vermittelte Signale spielen eine Rolle in vielen biologischen Prozessen einschließlich Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß Butyrat die Zelladhäsion und damit die Progression und das metastatische Potential kolorektaler Karzinome verringert.

Interleukin-1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort und Entzündung, indem es als Aktivator von T- und B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen arbeitet. In T-Zellen stimuliert Interleukin-1 die Produktion von Interleukin-2 und hemmt selektiv die Interleukin-4-Expression. Interleukin-1 induziert B-Zell-Proliferation, Reifung und Immunglobulin-Synthese. Natürliche Killerzellen benötigen Interleukin-1 beta zur Produktion des antipathogenen Interferon gamma. Interleukin-1 ist an der rheumatoiden Arthritis, den entzündlichen Darmerkrankungen und der Atherosklerose beteiligt. Es induziert den NFκB-Signalpfad und die Produktion von Interleukin-8. Dieser Pfad wird durch Glucocorticoide, Sulfasalazin und Butyrat unterdrückt. Erhöhte Interleukin-1 beta-Spiegel vermehren die

Adhäsion von Karzinomzellen an Endothelzellen und erhöhen ihr metastatisches Potential. Interleukin-1 beta erhöht den Cyclooxygenase-2-Proteinspiegel und fördert damit Entzündung, Angiogenese und Tumorentstehung, dem wiederum Butyrat entgegenwirkt.

Unsere Ergebnisse zeigen eine Verminderung von Entzündung, Tumor- und Metastasenentstehung durch Butyrat.

HMGA erleichtert zahlreiche DNA-bezogene Aktivitäten wie Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur durch Veränderung der DNA-Struktur und Organisation der Chromatinfasern. Das charakteristische funktionelle Motiv dieses Architekturelementes ist der AT-Haken. Er bindet Proteine an den kleineren Sulkus der DNA und streckt diese. HMGA moduliert zum Beispiel die induzierbare Form der Stickstoffoxid-Synthase, TNF-beta, IFN-beta, Interleukin-2-Rezeptor, E-Selectin, Interleukin-4 und T-Zell-Rezeptor-alpha. Die Effekte sind teils synergistisch mit NFκB, der im Gegensatz zu Butyrat die Apoptose inhibiert, und treten oft in der frühen Entwicklung auf. Das AT-Haken-Motiv bzw. HMGA-Protein tritt in vielen Karzinomarten (Kolon, Prostata, Schilddrüse, Lunge, Brust, Haut) auf.

Unsere Ergebnisse weisen auf eine erniedrigte Transkriptionsrate kolorektaler Karzinomzellen durch Butyrat hin.

Da es sich bei erhöhten Expressionen der Proteine Integrin-beta4, und HMGA um frühe Ereignisse im Übergang zu malignen Formen handelt, könnten diese auch als diagnostische und prognostische Marker in der chirurgischen Pathologie sowie als potentielles Ziel für Antikrebsmedikamente wie zum Beispiel Butyrat dienen.

Die Proteine Integrin beta-4, Interleukin-1 beta und HMGA affizieren fast alle bisher bekannten Butyrat-Wirkungspfade und werden dort von den Kolonkarzinomzelllinien zumindest in vitro unter Butyratinkubation vermindert exprimiert. Daraus ergibt sich ein weiterer Hinweis auf die karzinomprotektive Wirkung von Ballaststoffen in der täglichen Ernährung.

## **6 verwendete Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
But	Butyrat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDK	cyclin-dependent kinase
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
Cox	Cyclooxygenase
cpm	counts per minute
d	Tag
dATP	2`desoxyadenosin 5`triphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat-H <sub>2</sub> O
ddH <sub>2</sub> O	doppeltdestilliertes H <sub>2</sub> O
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenglykolbis-(aminoethylether)-tetraacetat
FA	Formaldehyd
FBS	Fetal bovine serum
h	Stunde
HRP	horseradishperoxidase
MA	milliampere
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOPS	3-Morpholinopropanesulfone acid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEAA	non-essential amino acids
NSAID	non steroidal anti-inflammatory drug
PG	Prostaglandin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RNA	Ribonucleic acid
rpm	roads per minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamid
TBS	Tris-buffered saline
Tris-HCl	Tris-Salzsäure
Tween	Polyoxyethylensobitan
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

## **7 Literaturverzeichnis**

- 1 Mastromarino AJ, Wargowich MJ. Etiology of colorectal cancer: dietary factors. *Cancer Bull* 1988;40:191-195.
- 2 Rogers AE, Zeisel SH, et al. Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993;14:2205-2217.
- 3 Stasse-Wolthuis M, Albers HFF, et al. Influence of dietary fiber from vegetables and fruits, bran or citrus pectin on serum lipids, fecal lipids, and colonic function. *Am J Clin Nutr* 1980;33:1745-1756.
- 4 Giovanucci E, Rimm EB, et al. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994;121:241-246.
- 5 Giovanucci E, Egan KM, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995;333:609-614.
- 6 Reddy BS, Rao CV, et al. Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis* 1993;14:1493-1497.
- 7 Newmark HL, Lipkin M. Calcium, vitamin D, and colon cancer. *Cancer Res* 1989;52:2067s-2070s.
- 8 Mayer R. Gastrointestinal Tract Cancer. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Fauci AS, Braunwald E, et al. New York, McGraw-Hill 1998:568-592.
- 9 McIntyre A, Gibson PR, et al. Butyrate production from dietary fiber and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* 1993;34(3):386-391.

- 10 Cummings JH. Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet* 1983;1:1206-1209.
- 11 Scheppach W. Bedeutung von Ballaststoffen für die Entstehung und Therapie gastroenterologischer Erkrankungen. *Akt Ernähr* 1991;16:143-145.
- 12 Cummings JH, Pomare EW, et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987;28:1221-1227.
- 13 Scheppach W, Bartram HP, et al. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995;31:1077-1080.
- 14 D'Argenio G, et al. Short-chain fatty acid in the human colon. Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999;472:149-158.
- 15 Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 1981;22:763-779.
- 16 Scheppach W, Kaspar H. Energieausbeute von Ballaststoffen. *Akt Ernähr* 1987;12:221-223.
- 17 Rowe WA, Bayless TM. Colonic short-chain fatty acids: fuel from the lumen? *Gastroenterology* 1992;103:336-338.
- 18 Macfarlane GT, Cummings JH. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: *The large intestine: Physiology, Pathophysiology, and Disease*, edited by Phillips SF, Pemberton JH, et al. Mayo Foundation, Raven Press, New York 1991;S.51-92.
- 19 Csordas A. Butyrate, aspirin and colorectal cancer.

Eur J Cancer Prev 1996;5:221-231

20 Roediger WEW. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. Gut 1980;21:793-798.

21 Mariadason JM, et al. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of CaCo-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation.

J Cell Physiol 2000;183(3):347-354.

22 Haza AI, et al. Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. Nutr Cancer 2000;36(1):79-89.

23 Compher CW, et al. Wheat bran decreases aberrant crypt foci, preserves normal proliferation, and increases intraluminal butyrate levels in experimental colon cancer. JPEN J Parenter Enteral Nutr 1999;23(5):269-278.

24 Archer S, Meng S, et al. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. Surgery 1998;124(2):248-253.

25 Jeanteur P. Dietary fibre intake and colon cancer.

Bull Cancer 1999;86(7-8):611-613.

26 Archer SY, et al. Histone acetylation and cancer.

Curr Opin Genet Dev 1999;9(2):171-4.

27 Rickard KL, et al. Short-chain fatty acids reduce expression of specific protein kinase C isoforms in human colonic epithelial cells. J Cell Physiol 2000;182(2):222-231.

- 28 Medina V, Edmonds B, et al. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): Dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* 1997;57:3697-3707.
- 29 Basson MD, Turowski GA, et al. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 1996;41:1986-1993.
- 30 Fogh JE. Human tumor cells in vitro. New, York, Plenum Press, 1975:115-159.
- 31 Leibovitz A, et al. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1976;36:4562-4569.
- 32 Aravind L, Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 1998;26:4413-4421.
- 33 Huth JR, Bewley CA, et al. The solution structure of an HMGI(Y)-DNA complex defined a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* 1997;4:657-665.
- 34 Johns EW. The HMG chromosomal proteins. Academic Press 1982, London, United Kingdom.
- 35 Wolffe AP, Kurumizaka H. The nucleosome: a powerful regulator of transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;61:379-422.
- 36 Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 1998;67:545-579.

- 37 Yie J, Liang S, et al. Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol Cell Biol* 1997;17:3649-3662.
- 38 Frank O, Schwanbeck R, et al. Protein footprinting reveals specific binding modes of a high mobility group protein I to DNAs of different conformation. *J Biol Chem* 1998;273:20015-20020.
- 39 Reeves R, Nissen M. Cell cycle regulation and functions of HMG-I(Y). *Prog Cell Cycle Res* 1995;1:339-349.
- 40 Schwanbeck R, Wisniewski JR. Cdc2 and mitogen-activated protein kinases modulate DNA binding properties of the putative transcriptional regulator Chironomus high mobility group protein I. *J Biol Chem* 1997;272:27476-27483.
- 41 Saitoh Y, Laemmli U. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 1994;76:609-622.
- 42 Zhao K, Kas E, et al. SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-depleted chromatin. *EMBO J* 1993;12:3237-3247.
- 43 Arlotta P, Rustighi A, et al. High mobility group I proteins interfere with the homeodomains binding to DNA. *J Biol Chem* 1997;272:29904-29910.
- 44 Farnet CM, Bushman FD. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 1997;88:483-492.
- 45 Li L, Farnet CM, et al. Modulation of activity of Moloney murine leukemia virus preintegration complexes by host factors in vitro. *J Virol* 1998;72:2125-2131.

- 46 Pellacani A, Chin M, et al. Induction of high mobility group-I(Y) protein by endotoxin and interleukin-1 beta in vascular smooth muscle cells: role in activation of inducible nitric oxide synthetase. *J Biol Chem* 1999;274:1525-1532.
- 47 Bustin M, Reeves R. High mobility group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996;54:35-100
- 48 Bagga R, Emerson BM. An HMG I/Y-containing repressor complex supercoiled DNA topology are critical for long-range enhancer-dependent transcription in vitro. *Genes Dev* 1997;11:629-639.
- 49 Mantovani F, Covaceuszach S, et al. NF-lambdaB mediated transcriptional activation is enhanced by the architectural factor HMGI-C. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1433-1439.
- 50 Thanos D, Maniatis T. NF-lambdaB: a lesson in family values. *Cell* 1995;80:529-532.
- 51 Chin MT, Pellacani A, et al. Enhancement of serum-response factor-dependent transcription and DNA binding by the architectural transcription factor HMG-I(Y). *J Biol Chem* 1998;273:9755-9760.
- 52 Thanos D, Maniatis T. Virus induction of IFN(beta) gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 1995;83:1091-1100.
- 53 Munshi N, Merika M, et al. Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell* 1998;2:457-467.
- 54 Giacotti V, Berlingieri MT, et al. Changes in nuclear proteins on transformation of rat epithelial thyroid cells by a murine sarcoma retrovirus.

Cancer Res 1985;45:6051-6057.

55 Giaccotti V, Pani B, et al. Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with v-ras and v-mos oncogenes and by cotransfection with c-myc and polyoma middle T genes. EMBO J 1987;6:1981-1987.

56 Zhou X, Chada K. HMGI family proteins: architectural transcription factors in mammalian development and cancer. Keio J Med 1998;47:73-77.

57 Chiappetta G, Tallini G, et al. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. Cancer Res 1998;58:4193-4198.

58 Goodwin G. The high mobility group protein, HMGI-C.  
Int J Biochem Cell Biol 1998;30:761-766.

59 Ashar HR, Cherath L, et al. Genomic characterization of human HMGIC, a member of the accessory transcription factor family found at translocation breakpoints in lipomas.  
Genomics 1996;31:207-214.

60 Kazmierczak B, Bullerdiek J, et al. Intron 3 of HMGIC is the most frequent target of chromosomal aberrations in human tumors and has been conserved basically for at least 30 million years. Cancer Genet Cytogenet 1998;103:175-177.

61 Kazmierczak B, Dal Cin P, et al. HMGIY is the target of 6p21.3 rearrangements in various benign mesenchymal tumors. Genes Chromosomes Cancer 1998;23:279-285.

62 Kazmierczak B, Rosigkeit J, et al. HMGI-C rearrangements as the molecular basis for the majority of pulmonary chondroid hamartomas: a survey of 30 tumors. Oncogene 1996;12:515-521.

- 63 Tkachenko A, Ashar HR, et al. Misexpression of disrupted HMGI architectural factors activates alternative pathways of tumorigenesis. *Cancer Res* 1997;57:2276-2280.
- 64 Williams A, Powell WL, et al. HMGI(Y) expression in human uterine leiomyomata. Involvement of another high mobility group architectural factor in a benign neoplasm. *Am J Pathol* 1997;150:911-918.
- 65 Hill DA, Reeves R. Competition between HMG-I(Y), HMG-1 and histone H1 on four way junction DNA. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3523-3531.
- 66 Yaneva J, Leuba SH, et al. The major chromatin protein histone H1 binds preferentially to cis-platinum-damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13448-13451.
- 67 Abe N, Watanabe T, et al. Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker. *Cancer Res* 1999;59(6):1169-1174.
- 68 Kim DH, Park YS, et al. Expression of the HMGI(Y) gene in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 1999;84(4):376-380.
- 69 Chiappetta G, Manfioletti G, et al. High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases. *Int J Cancer* 2001;91(2):147-151.
- 70 Fedele M, Bandiera A, et al. Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins. *Cancer Res* 1996;56(8):1896-1901.
- 71 Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.

Cell 1992;69:11-25.

72 Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-239.

73 Miyamoto S, Akiyama SK, et al. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 1995;267:883-885.

74 Sheppard D. Epithelial integrins. *Bio Essays* 1996;18:655-660.

75 Juliano R. Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell-anchorage in the control of cell growth and differentiation. *Bio Essays* 1996;18:911-917.

76 Kambham N, et al. Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with beta4 integrin mutation and epidermolysis bullosa. *Am J Kidney Dis* 2000;36(1):190-196.

77 Inoue M, et al. A homozygous missense mutation in the cytoplasmic tail of beta4 integrin, G931D, that disrupts hemidesmosome assembly and underlies Non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa without pyloric atresia? *J Invest Dermatol* 2000;114(5):1061-1064.

78 De Arcangelis A, Lefebvre O, et al. Overexpression of laminin alpha 1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. *Int J Cancer* 2001;94(1):44-53

79 Clarke AS, Lotz MM, et al. A novel structural variant of the human beta 4 integrin cDNA. *Cell Adhes Commun* 1994;2(1):1-6.

80 Mohri T, Adachi Y, et al. Activated Rac 1 selectively up-regulates the expression of integrin alpha6beta4 and induces cell adhesion and membrane ruffles of nonadherent colon cancer Colo201 cells. *Exp Cell Res* 1999;253(2):533-540.

- 81 Nievers MG, et al. Ligand-independent role of the beta 4 integrin subunit in the formation of hemidesmosomes. *J Cell Sci* 1998;111(Pt12):1659-1672.
- 82 Rezniczek GA, et al. Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol* 1998;141(1):209-225.
- 83 Sanvito F, et al. Expression of a highly conserved protein, p27BBP, during the progression of human colorectal cancer. *Cancer Res* 2000;60(3):510-516.
- 84 Daemi N, Thomasset N, et al. Anti-beta4 integrin antibodies enhance migratory and invasive abilities of human colon adenocarcinoma cells and their MMP-2 expression. *Int J Cancer* 2000;85(6):850-856.
- 85 Basora N, et al. Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation in human intestinal cells. *J Biol Chem* 1999;274(42):29819-29825.
- 86 Murgia C, et al. Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *EMBO J* 1998;17(14):3940-3951.
- 87 Suzuki K, et al. Reduced substratum adhesion and decreased expressions of 1 and 4 integrins in human breast cancer cells with a property of anchorage-independent growth. *Int J Oncol* 1999;14(5):897-904.
- 88 Harabayashi T, et al. Reduction of integrin beta4 and enhanced migration on laminin in association with intraepithelial spreading of urinary bladder carcinomas. *J Urol* 1999;161(4):1364-1371.

- 89 Ramarli D, et al. Thymocyte contact or monoclonal antibody-mediated clustering of 3beta1 or 6beta4 integrins activate interleukin-6 (IL-6) transcription factors (NF-kappaB and NF-IL6) and IL-6 production in human thymic epithelial cells. *Blood* 1998;92(10):3745-3755.
- 90 Allen MV, et al. Downregulation of beta4 integrin subunit in prostatic carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 1998;29(4):311-318.
- 91 Clarke AS, et al. Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the beta 4 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1995;270(39):22673-22676.
- 92 March CJ, Mosley B, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985;315:641-647.
- 93 Auron PE, Webb AC, et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7907-7911.
- 94 Sadouk MB, Pelletier JP, et al. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Lab Invest* 1995;73:347-355.
- 95 Lonnemann G, Shapiro L, et al. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. *Kidney Intl* 1995;47:837-844.
- 96 Zuniga-Pflucker JC, Di J, et al. Requirement for TNF-alpha and IL-1alpha in fetal thymocyte commitment and differentiation. *Science* 1995;268:1906-1909.
- 97 Sandborg CI, Imfeld KL, et al. IL-4 expression in human T cells is selectively inhibited by IL-1alpha and IL-1beta. *J Immunol* 1995;155:5206-5212.

- 98 Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77:1627-1652.
- 99 Jin SH, Kim TI, et al. Thalidomide suppresses the interleukin 1beta-induced NFkappaB signaling pathway in colon cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002;937:414-418.
- 100 Gan H, Ouyang Q, et al. Activation of nuclear factor-kappaB and its relationship with cytokine gene expression in colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2002;41(4):252-255.
- 101 Inan MS, Place R, et al. IkappaBbeta-related proteins in normal and transformed colonic epithel cells. *Mol Carcinog* 2000;29(1):25-36.
- 102 Simiantonaki N, Jayasinghe C, et al. Effect of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules in vitro. *Exp Mol Pathol* 2002;73(1):46-53.
- 103 Minami S, Furui J, et al. Role of carcinoembryonic antigen in the progression of colon cancer cells that express carbohydrate antigen. *Cancer Res* 2001;61(6):2732-2735.
- 104 Yoshida N, et al. Effect of shear stress and a stable prostaglandin I2 analogue on adhesive interactions of colon cancer cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1999;117(3):430-434.
- 105 Matsushita Y, et al. Selectins induced by interleukin-1beta on the human liver endothelial cells act as ligands for sialyl Lewis X-expressing human colon cancer cell metastasis. *Cancer Lett* 1998;133(2):151-160.

106 Sawada R, et al. Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials.

J Biol Chem 1994;269(2):1425-1431.

107 Koshiji M, et al. Mechanisms underlying apoptosis induced by combination of 5-fluorouracil and interferon-gamma.

Biochem Biophys Res Commun 1997;240(2):376-381.

108 van Rossen ME, Hofland LJ, et al. Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum. J Pathol 2001;193(4):530-537.

109 Tran-Thang C, et al. Modulation of the plasminogen activation system by inflammatory cytokines in human colon carcinoma cells.

Br J Cancer 1996;74(6):846-852.

110 Deng WG, Saunders MA, et al. Purification and characterization of a cyclooxygenase-2 and angiogenesis suppressing factor produced by human fibroblasts. FASEB J 2002;16(10):1286-1288.

111 Lührs H, Schaubert J, et al. Butyrate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B activation. Gastroenterology 1999;116(4):A 563

112 Bamba H, Ota S, et al. Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells.

Biochem Biophys Res Commun 2000;273(2):485-491.

113 Ota S, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may prevent colon cancer through suppression of hepatocyte growth factor expression.

Eur J Pharmacol 1999;367(1):131-138.

114 Calatayud S, Warner TD, et al. Relationship between endogenous colony stimulating factors and apoptosis in human colon cancer cells: role of cyclo-oxygenase inhibitors.

Br J Pharmacol 2001;134(6):1237-1244.

115 Colombo MP, et al. Hypoxic tumor cell death and modulation of endothelial adhesion molecules in the regression of granulocyte colony-stimulating factor-transduced tumors. Am J Pathol 1996;148(2):473-483.

116 Lührs H, Gerke T, et al. Cytokine-activated degradation of inhibitory kappa B protein alpha is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate.

Int J Colorectal Dis 2001;16(4):195-201.

117 Scheppach W. Lokalthherapie der distalen Colitis und Proctitis ulcerosa.

Dtsch Med Wochenschrift 1993;118:751-754.

118 Huang N, et al. Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. Cytokine 1997;9(1):27-36.

119 Onier N, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. Int J Cancer 1999;81(5):755-760.

120 Invernizzi P, et al. Ursodeoxycholate inhibits induction of NOS in human intestinal epithelial cells and in vivo. Am J Physiol 1997;273(1 Pt 1):G131-138.

121 Jarry A, et al. Interleukin 1 and interleukin 1beta converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer.

Gut 1999;45(2):246-251.

122 Bjorge L, et al. Characterisation of the complement-regulatory proteins decay-accelerating factor (DAF, CD55) and membrane cofactor protein (MCP, CD46) on a human colonic adenocarcinoma cell line.

Cancer Immunol Immunother 1996;42(3):185-192.

123 Koch I, et al. Interleukin 1 modulates growth of human renal carcinoma cells in vitro. Br J Cancer 1995;71(4):794-800.

124 Leung KL, Lai PB, et al. Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: A prospective randomized trial.

Ann Surg 2000;231(4):506-511.

125 Cafferata EG, et al. Interleukin-1beta regulates CFTR expression in human intestinal T84 cells. Biochim Biophys Acta 2000;1500(2):241-248.

126 Lahav M, Levite M, et al. Lidocaine inhibits secretion of IL-8 and IL-1beta and stimulates secretion of IL-1 receptor antagonist by epithelial cells.

Clin Exp Immunol 2002;127(2):226-233.

127 Etzrodt G, Lührs H, et al. Butyrat senkt die Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in kolorektalen Karzinomzellen.

Abstraktband der 2. Bad Brückenauer Wintertagung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg 2001: 11.

128 Weber F, Lührs H, et al. Die Butyrat-vermittelte Modulation von Proliferation und Differenzierung in Kolonkarzinomzellen ist mit einer vermehrten Expression von PPAR gamma verbunden.

Abstraktband der 2. Bad Brückenauer Wintertagung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg 2001: 56.

129 Lührs H, Hock R, et al. Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells.

Int J Cancer 2002;97(5):567-573.

130 Weihrauch M, Menzel T, et al. Butyrat moduliert die mRNA-Expression der HMG-Proteine I(Y) (nach der neuen Nomenklatur:A) und 14/17 (nach der neuen Nomenklatur:N) in gastrointestinalen Karzinomzellen. Abstraktband der 2. Bad Brückenauer Wintertagung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg 2001: 57.

131 Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. Gastroenterology 2000;119:854-865.

132 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis.

Cell 1990;61(5):759-767.

133 Eberhart CE, Coffey RJ, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas.

Gastroenterology 1994;107(4):1183-1188.

134 Büchele T, Grothey A, et al. Neue Perspektiven mit neuen Zytostatika in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms. Onkologe 2000;6:410-419.

135 Weaver GA, Krause JA, et al. Short chain fatty acid distributions of enema samples from a sigmoidoscopy population: an association of high acetate and low butyrate ratios with adenomatous polyps and colon cancer. Gut 1988;29(11):1539-1543.

136 Bustin M.. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins.

Trends in Biochemical Sciences 2001;26(3):152-153.

137 Herold G. und Mitarbeiter. Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln  
1999: 390-392.

## **8 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach, Leiter des Schwerpunktes Gastroenterologie an der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas, die freundliche Betreuung und die Möglichkeit, in seinem Labor meine Promotionsarbeit durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Gassel, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. med. H. Lühns und Herrn Dr. med. T. Menzel danke ich für die freundliche Betreuung während der Arbeit.

Weiterhin sage ich den Mitarbeiterinnen des Gastroenterologischen Labors Frau Kerstin Backhaus, Frau Elisabeth Kelber, Frau Donata Kuhn, Frau Astrid Katzer und Frau Gerda Dusel Dank für ihre Unterstützung während der Arbeit im Labor.



## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Klaus Burzer  
Geburtsdatum: 12.09.1967  
Geburtsort: Nürnberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung/Ausbildung:

1973-77 Grundschule, Diespeck  
1977-80 Friedrich-Alexander Gymnasium, Neustadt a. d. Aisch  
1980-86 Wirsberg-Gymnasium, Würzburg; Abitur

### Wehrdienst:

1986-87 Grundwehrdienst in Gerolstein/Eifel und Volkach

### Studium:

1987-93 Studium der Humanmedizin, Bayerische Julius-Maximilians-Universität,  
Würzburg, Ärztliche Prüfung

### Ärztliche Weiterbildung:

1994-6/2000 Kreiskrankenhaus Neustadt/Aisch, Medizinische Klinik, AIP,  
Assistenzarzt, Internist seit 15.03.2000,  
Zusatzbezeichnung Sportmedizin

### Fachärztliche Tätigkeit:

seit 7/2000 Sportmedizinisches Institut, Frankfurt/Main e. V.,  
Abteilung Innere Medizin/Leistungsdiagnostik,  
Internist, Sportmedizin