

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

Butyrat moduliert die Expression der Nicht-Histon Proteine HMGA1, HMGN1 und HMGN2
in humanen Adenokarzinomzellen des Kolons und des Magens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Marc-Andreas Günter Weihrauch
aus 56073 Koblenz

Würzburg, Januar 2004

Referent: Professor Dr. med. W. Scheppach

Korreferent: Priv.-Doz. Dr.med. Dr.rer.nat. M. Fein

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juni 2004

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Karzinom	1
1.2 Das Magenkarzinom	4
1.3 Die Bedeutung von Ballaststoffen und Butyrat in der Karzinogenese	5
1.4 HMG Proteine	9
1.4.1 HMGN-Proteine	10
1.4.2 HMGA-Proteine	11
1.5 Ziel dieser Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien-Zusammensetzungen	16
2.1.4 Antikörper	16
2.1.5 Chemikalien und Enzyme	16
2.2 Methoden	18
2.2.1 Zellkultur	18
2.2.2 RNA-Isolierung	19
2.2.3 Northern Blotting	20
3. Ergebnisse	25
3.1 Vergleich der Expression von HMGA1 sowie HMGN1 und HMGN2 in humanen Sw-480 und Sw-620 Adenokarzinomzellen	25
3.2 Ergebnisse der Northern-Blot Untersuchungen in humanen Sw-480 Adenokarzinomzellen	26
3.3 Ergebnisse der Northern-Blot Untersuchungen in humanen Sw-620 Adenokarzinomzellen	29
3.4 Ergebnisse der Northern-Blot Untersuchungen in humanen 23132/87 Magenadenokarzinomzellen	33

4. Diskussion	36
4.1 Butyrat- und TSA- vermittelte Modulation der mRNA-Expression von HMGA1 in humanen Kolon- und Magenkarzinomzelllinien	36
4.1.1 Basalexpression von HMGA1 und Modulation der HMGA1-Expression durch Butyrat und TSA	36
4.1.2 Auswirkungen der Butyrat- und TSA-vermittelten Modulation der HMGA1-Expression auf die Karzinogenese humaner Malignome	39
4.1.3 Modulation der HMGA1-Expression und Funktion als mögliche Therapieform in der Behandlung humaner Malignome	42
4.2 Butyrat-vermittelte Modulation der mRNA-Expression von HMGN1 und N2 in humanen Kolon- und Magenkarzinomzelllinien	44
5. Zusammenfassung	50
6. Literaturverzeichnis	52

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Im Jahre 1998 standen maligne Erkrankungen des Kolons und des Rektums bei beiden Geschlechtern in Deutschland an zweiter Stelle der krebsbedingten Sterbefälle; bei Frauen waren dies 12,6 %, bei Männern 15,4 %. Auch bei den Neuerkrankungen stehen die kolorektalen Karzinome mit an vorderster Stelle: bei Frauen an zweiter Stelle nach dem Mammakarzinom, bei den Männern nach Karzinomen der Prostata und der Lunge. Damit erkranken in Deutschland jährlich etwa 30.000 Frauen und etwa 27.000 Männer erstmals am kolorektalen Karzinom. Das Erkrankungsalter liegt bei den Frauen im Mittel bei 72 Jahren, Männer erkranken etwas früher mit 67 Jahren. Bei einer relativen 5 – Jahres-Überlebensrate von 48 % bei Männern und 51 % bei Frauen beträgt der Verlust an Lebenserwartung für beide Geschlechter etwa 6 Jahre. In der Europäischen Union liegt Deutschland bei beiden Geschlechtern bezüglich der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms an der Spitze, während in Finnland, Griechenland und in Spanien die Inzidenzen am niedrigsten sind [1]. Im Zuge der Arbeiten der Gruppe um Vogelstein hat sich das Wissen um die molekulargenetischen Veränderungen beim kolorektalen Karzinom in den letzten Jahren erheblich vergrößert und so zum verbesserten Verständnis der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms beigetragen [2].

Beim kolorektalen Karzinom lassen sich genetisch definierte und sporadische Formen unterscheiden, wobei letztere deutlich überwiegen. Außerdem finden sich kolorektale Karzinome häufig bei langjährig bestehenden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, infektiösen Darmerkrankungen wie der Schistosomiasis und als Folge von operativen Eingriffen wie bei der Ureterosigmoideostomie [3].

Die Formen mit eindeutig genetisch definierten Veränderungen machen etwa 10 % der kolorektalen Karzinome aus. Im Einzelnen sind dies die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC, Synonym: Lynch-Syndrom).

Die FAP ist eine obligate Präkanzerose und für etwa 1 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich. Ursächlich sind Mutationen des APC-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 5q21, welche autosomal-dominant vererbt werden, bzw. durch Neumutationen entstehen. Es kommt zum Auftreten multipler Adenome im Kolorektum

mit sehr hohem Entartungsrisiko [4]. Beim Lynch-Syndrom (zwischen 3% und 6% aller kolorektaler Karzinome) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit Mutationen unterschiedlicher DNA-Reparaturgene. Deutlich früher als bei den sporadischen Formen, nämlich schon im vierten Lebensjahrzehnt, treten vorzugsweise proximal lokalisierte Kolonkarzinome auf [4].

Daneben ist auch das Auftreten von kolorektalen Karzinomen in der Familienanamnese mit einem erhöhten Krankheitsrisiko verbunden, ohne dass hier genetisch eindeutig definierte Defekte vorliegen.

Der überwiegende Anteil der sporadischen kolorektalen Karzinome entwickelt sich aus Epitheldysplasien im Zuge der Adenom-Karzinom-Sequenz. Über 95 % dieser Epitheldysplasien stellen Adenome dar. Diese sind noch gutartige Neubildungen der Schleimhaut, welche auf Grund ihres histologischen Aufbaues in tubuläre (75 %), villöse (5 %) und tubulovillöse (20 %) Adenome unterteilt werden können und ein unterschiedliches Entartungsrisiko besitzen; dieses ist für das villöse Adenom am höchsten und nimmt über das tubulovillöse zum tubulären Adenom hin ab. Neben dem histologischen Aufbau haben ebenfalls Atypiegrad, Größe des Adenoms und die Erkrankungsdauer einen Einfluss auf das Entartungsrisiko [3].

Die molekularbiologischen Veränderungen vom Normalgewebe über das Adenom hin zum Karzinom können unter dem Begriff der Tumorprogression subsumiert werden. Über einen Zeitraum von etwa 5 Jahren akkumuliert eine Vielzahl genetischer Veränderungen wie die Aktivierung von Onkogenen und/oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen. Ist eine Anzahl kritischer molekulargenetischer Veränderungen eingetreten, werden die Zellen maligne transformiert und gehen schließlich vom kontrollierten zum unkontrollierten Wachstum über.

Betrachtet man die unterschiedlichen Inzidenzen des kolorektalen Karzinoms in Industriestaaten und in Entwicklungsländern, aber auch die unterschiedlichen Inzidenzen innerhalb der Europäischen Union, so liegt der Schluss nahe, dass nicht nur genetische Faktoren eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese der kolorektalen Karzinome spielen. Vielmehr haben Umweltfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms. Der Einfluss dieser sogenannten exogenen Faktoren wird als so erheblich angesehen, dass eine Expertenkommission des World Cancer Research Fund zu folgendem Ergebnis kam: Bis zu 50% der Kolontumoren ließen sich durch eine Modifikation der Ernährungsgewohnheiten vermeiden [5]. Dieser

Einfluss der Ernährungsgewohnheiten auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist Gegenstand zahlreicher Studien und Untersuchungen und es gibt zahlreiche Erkenntnisse, inwiefern Ernährungsgewohnheiten und der Lebensstil Risikofaktoren darstellen. Folgende Ernährungsgewohnheiten sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko behaftet: Fleischkonsum, v.a. der Verzehr von „rotem“ Fleisch, fettreiche Ernährung und Alkoholkonsum. [6] [7] [8, 9] Dagegen hat eine Ernährung reich an Gemüse einen erheblichen protektiven Effekt.

Aber auch nichternährungsspezifische Lebensgewohnheiten haben einen entscheidenden Einfluss auf das Vorkommen von kolorektalen Karzinomen: Körperlich aktive Menschen erkranken deutlich seltener als körperlich inaktive [10]. Obwohl der schädigende Wirkmechanismus des Zigarettenrauches noch nicht identifiziert ist, besteht auch ein inverser statistischer Zusammenhang zwischen der Zigarettenrauchexposition und dem Erkrankungsrisiko [7].

Problematisch beim kolorektalen Karzinom ist das Fehlen von charakteristischen Frühsymptomen. Noch operativ kurable Tumore werden oftmals nicht rechtzeitig diagnostiziert, so dass eine kurative Therapie nicht mehr möglich ist.

Zur Senkung der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms bzw. zur Verringerung dessen Mortalität müssen geeignete Präventivmaßnahmen ergriffen werden. Diese sind auf den Stufen der Primär- bzw. Sekundär- und Tertiärprävention möglich [11].

Maßnahmen der Primärprävention, also der Vermeidung krankheitsauslösender bzw. krankheitsförender Faktoren, erscheinen beim kolorektalen Karzinom besonders effektiv und sinnvoll. Zum einen greifen nur diese direkt in die Karzinogenese ein und haben damit auch das größte Verhütungspotential, zum anderen sind sie auch kostengünstiger. Als Nebeneffekt schützen zum Beispiel fettarme Ernährung, Verzicht auf Nikotin und regelmäßige körperliche Aktivität auch vor anderen Erkrankungen wie z.B. der koronaren Herzkrankheit und weiteren „Zivilisationskrankheiten“.

Neben Ernährungsumstellung bzw. Änderung der Lebensgewohnheiten kommt als weitere Maßnahme der Primärprävention die Chemoprävention mittels geeigneter Medikamente in Betracht. In zahlreichen epidemiologischen Studien zeigt sich zum Beispiel für Aspirin ein inverser Zusammenhang zwischen Acetylsalicylsäureeinnahme und dem Karzinomrisiko. In klinischen Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit der Behandlung mit HMG-CoA-Reduktasehemmern nach einem Herzinfarkt wurden bei dem untersuchten Patientenkollektiv deutlich weniger Kolontumore diagnostiziert. Bei

Patienten mit Colitis ulcerosa, welche zur Remissionserhaltung langfristig mit Sulfasalazin behandelt wurden, traten signifikant weniger Tumore auf. Auch eine postmenopausale Östrogensubstitution ist mit einem deutlich niedrigeren Erkrankungsrisiko verbunden [11].

Auch wenn schon zahlreiche Daten für die protektive Wirkung verschiedener Substanzgruppen vorliegen, fehlen doch geeignete klinische Studien, um die Einnahme von Medikamenten zur Chemoprävention zu empfehlen. Ähnlich verhält es sich mit Nahrungssupplementen wie Vitaminen oder Spurenelementen.

Die Sekundärprävention hat die Krankheitsfrüherkennung und Behandlung von Vorläufern des Kolonkarzinoms zum Ziel [12]. Studien konnten zeigen, dass Screeninguntersuchung bzw. Früherkennungsmaßnahmen wie der Test auf okkultes Blut im Stuhl, die Sigmoidoskopie und die Koloskopie in der Lage sind, behandelbare Frühformen des kolorektalen Karzinoms ausfindig zu machen und dessen Mortalität zu senken [13] [14] [15].

1.2 Das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom gehört mit zu den häufigsten krebserkrankten Todesursachen in Deutschland. Jährlich erkranken hier etwa 18.500 Menschen neu am Magenkarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei beiden Geschlechtern höher als bei übrigen Krebserkrankungen; bei Männern liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 68 Jahren, bei Frauen ist es das 74. Lebensjahr. Während in Deutschland und in Europa die Neuerkrankungsraten in den letzten 30 Jahren rückläufig sind, ist das Magenkarzinom weltweit nach dem malignen Melanom der zweithäufigste maligne Tumor. So finden sich beispielsweise sehr hohe Inzidenzen in Japan und in China.

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 27 % bei Männern bzw. 28 % bei Frauen [1].

Der überwiegende Anteil der Magenkarzinome sind Adenokarzinome, seltener sind Plattenepithelkarzinome, kleinzellige oder undifferenzierte Karzinome. Von der Magenschleimhaut ausgehende Lymphome werden den Non-Hodgkin-Lymphomen zugerechnet [3].

Eine Helicobacter pylori bedingte chronische Gastritis ist eine entscheidende Ursache für die Entstehung des Magenkarzinoms. So wird geschätzt, dass in etwa 10 Prozent der Patienten mit einer chronischen Gastritis ein Magenkarzinom entwickeln [16]. Weiter

scheinen nahrungsbedingte Faktoren eine Rolle zu spielen, eine Übersicht hierzu liefert Thomson et al. [17]. Diskutiert werden vor allem Nitrosamine in der Nahrung, welche in stark gesalzenen, gepökelten und geräucherten Nahrungsmitteln vorkommen. Auch ein Mangel an frischem Obst und Gemüse scheint ein Risikofaktor zu sein. Widersprüchlich ist die Datenlage hinsichtlich der Bedeutung von Alkohol. Weitere Risikofaktoren sind familiäre Belastung sowie der Morbus Ménétrier und Z.n Billroth-II-Operation. Als Präkanzerosen zählen außerdem das Magenadenom und die intestinale Metaplasie [3].

Derzeit einzig kuratives Therapieverfahren beim Magenkarzinom ist die Operation, allerdings können derzeit nur ca. 30 % der Patienten unter kurativer Zielsetzung operiert werden. Andere Therapieverfahren wie Chemo- oder Strahlentherapie werden nur palliativ eingesetzt [18].

In Hinblick auf die beschränkten therapeutischen Optionen und die hohe Letalität ist es notwendig, die Neuerkrankungsraten des Magenkarzinoms zu senken. Hierzu bieten sich geeignete Maßnahmen der Primärprävention an. Da Nahrungsfaktoren zu einem nicht unerheblichen Anteil als ursächlich in der Pathogenese des Magenkarzinoms angesehen werden, kommen Experten zu dem Schluss, dass durch eine Umstellung der Ernährungsgewohnheiten die Mortalität des Magenkarzinoms erheblich gesenkt werden kann. Allein durch eine vermehrte Zufuhr von Gemüse könne die Mortalität um ein Drittel gesenkt werden [17]. Auch durch eine frühzeitige Eradikation von *Helicobacter pylori* Infektionen könnte eine große Anzahl von Magenkarzinomen verhindert werden [19].

1.3 Die Bedeutung von Ballaststoffen und Butyrat in der Karzinogenese

Die Frage, ob eine ballaststoffreiche Ernährung vor dem Auftreten von Karzinomen des Kolons und des Rektums schützt, wird derzeit in der Literatur kontrovers diskutiert. Aktuelle Auswertungen der Nurses Health Study [20] zufolge besteht kein Zusammenhang zwischen einer ballaststoffreichen Ernährung und der Inzidenz von Adenomen und Karzinomen des Kolons. Ähnliche Ergebnisse liefern Studien aus Finnland [21] und Schweden [22]. Daneben zeigen die zur Verfügung stehenden Daten aus epidemiologischen Untersuchungen und Interventionsstudien sowie tierexperimentelle Untersuchungen einen schützenden Effekt einer Ballaststoffaufnahme vor der Erkrankung am kolorektalen Karzinom [23]. In neueren,

multizentrisch durchgeführten Studien wurde ein inverser Zusammenhang zwischen einer erhöhten Ballaststoffaufnahme und dem Erkrankungsrisiko am kolorektalen Karzinom festgestellt [24].

Ballaststoffe sind Kohlenhydrate, die nach Nahrungsaufnahme nicht resorbiert werden, bis ins distale Kolon gelangen und hier der Fermentation durch die anaerobe Standortflora unterliegen. Die dabei entstehenden kurzkettigen Fettsäuren Butyrat, Propionat und Acetat werden als erhebliche Faktoren der antikarzinogenen Wirkung einer ballaststoffhaltigen Ernährung angesehen. Sie entstehen mit einem durchschnittlichen molaren Verhältnis von Acetat : Propionat : Butyrat von etwa 60 : 25 : 10 mmol/l [25]. Dieses Mengenverhältnis ist keine konstante Größe, sondern abhängig von der Art und Menge des Substratangebotes. Potentiell protektive Wirkungen der Ballaststoffe sind: Erhöhung des Stuhlgewichtes und Beschleunigung der Transitzeit, Verdünnung und Bindung karzinogener Substanzen, Verminderung des pH-Wertes und verminderte Produktion sekundärer Gallensäuren, welche als potentiell karzinogen angesehen werden [26] [27] [28] [29] [30].

Von den entstehenden kurzkettigen Fettsäuren spielt Butyrat eine besondere Rolle: Butyrat dient als Hauptenergielieferant der Kolonozyten und hat darüber hinaus noch Einfluß auf zahlreiche andere Funktionen des Zellstoffwechsels [31]. Die Konzentrationen von Butyrat im peripher-venösen Blut sind zwar gering, da die Leber einen Großteil des Butyrats aus dem portal-venösen Blut eliminiert [25], jedoch konnten Wolever und Mitarbeiter zeigen, dass sich die Butyrat-Spiegel im peripher-venösen Blut durch Behandlung mit Acarbose signifikant erhöhen ließen [32].

Betrachtet man die Wirkungen der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auf das Wachstumsverhalten normaler Kolonschleimhaut und maligne transformierten Epithels, so findet man einen scheinbar paradoxen Effekt: Während *in vitro* die Proliferation neoplastischen Gewebes gehemmt wird, stimuliert Butyrat (und zu einem geringeren Anteil auch Propionat und Acetat) das Wachstum des normalen Kolonepithels [33].

Das Wachstum des normalen Kolonepithels vollzieht sich ausschließlich in den basalen Abschnitten der Krypten, während in den höheren Abschnitten die Proliferation stoppt und die Epithelzellen ausdifferenzieren; dieser Vorgang nimmt etwa 7 Tage in Anspruch. Butyrat und die anderen kurzkettigen Fettsäuren stimulieren das Wachstum des Kolonepithels ausschließlich in diesem physiologischen Wachstumskompartiment, ohne eine Ausdehnung der Proliferation in die oberen Abschnitte der Krypten zu bewirken [27] [33].

Eine Ausdehnung der Wachstumszone auf die oberen Abschnitte der Krypten wird als Hyperproliferation bezeichnet und als ein präneoplastischer Marker angesehen. *In vitro* kann eine Hyperproliferation durch Inkubation von Kolonschleimhaut mit Desoxycholsäure, einer sekundären Gallensäure, welche sich in zahlreichen Tiermodellen als Ko-Karzinogen herausgestellt hat, erzeugt werden. Bei Koinkubation von Butyrat und Desoxycholsäure wird die hyperproliferative Wirkung der Desoxycholsäure durch Butyrat antagonisiert. Die Wirkungen von Butyrat auf hyperproliferative Kolonschleimhaut unterscheiden sich somit deutlich von der Wirkung auf normale Schleimhaut [34].

In zahlreichen humanen Adenom- und Karzinomzelllinien hemmt Butyrat Proliferation, fördert Differenzierung und induziert Apoptose. Die Wirkungen der kurzkettigen Fettsäuren konnten *in vitro* nicht nur auf maligne transformierte Epithelzellen des Kolons, sondern auch auf Magenkarzinom-, Prostatakarzinom- und Leukämiezellen nachgewiesen werden [35] [36] [37].

Die Art und Weise, wie Butyrat seine Wirkungen vermittelt, ist noch Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Ein Teil der antikarzinogenen Effekte von Butyrat kann durch eine Modulation der Expression verschiedener Proteine erklärt werden. Die Proliferationshemmung beruht nicht nur auf einem cytotoxischen Effekt, den Butyrat in höheren Konzentrationen auf maligne transformierte Zellen ausübt [38] [39] [40] [41] [42] [43], sondern auch auf einer Modulation von Faktoren der Zellzykluskontrolle. Regulative Elemente des Zellzyklus sind Cycline und Cyclinabhängige Kinasen (CDK), sowie deren Gegenspieler, die CDK-Inhibitoren [44] [45]. Butyrat moduliert die Expression einiger dieser regulativen Elemente; so werden die CDK-Inhibitoren p21 und p16 induziert, die Expression der Cyclinabhängigen Kinase 2 dagegen vermindert [46] [47] [48]. Auch durch Modifikationen anderer regulativer Elemente des Zellzyklus, wie beispielsweise der Dephosphorylierung des Retinoblastomproteins, ist Butyrat an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt [49].

Butyrat induziert Apoptose in humanen Kolonkarzinomzelllinien. In maligne transformierten Kolonozyten sind im Vergleich zur normalen Kolonschleimhaut die Apoptoserate und die Expression pro-apoptotischer Proteine, wie beispielsweise *bak*, deutlich reduziert [50]. Butyrat fördert zum einen Apoptose über eine Induktion der Expression pro-apoptotischer Faktoren; so wird die Expression von Caspase-3 durch Butyrat induziert [51] [52]. Zum anderen wirkt Butyrat unter anderem über eine Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber der Fas-vermittelten Apoptose pro-

apoptotisch [53] [54]. Es konnte gezeigt werden, dass Butyrat auch die Expression einer Vielzahl weiterer Faktoren moduliert (Bcl-2, Bax, p53, p21, PCNA), welche an der Apoptoseregulation beteiligt sind [55]. Neben diesen Wirkungen von Butyrat auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms beeinflusst Butyrat auch das Verhalten bereits manifester Neoplasien. So moduliert Butyrat beispielsweise die Expression von Faktoren, die eine Invasion von Karzinomzellen in das umliegende Gewebe ermöglichen [56]. Ebenfalls werden immunologische Eigenschaften von Tumorzellen verändert; so kommt es zum Beispiel zu einer vermehrten Expression von MHC Klasse 1 Proteinen und zu einer vermehrten Empfindlichkeit gegenüber Killerzellen. Die antikanzinogenen und anti-proliferativen Eigenschaften von Butyrat könnten so teilweise über eine Veränderung immunologischer Eigenschaften von Karzinomzellen vermittelt werden [57].

Bislang ist noch relativ wenig über die antikanzinogenen Wirkungen von Butyrat in humanen Magenkarzinomen bekannt. Tsai und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Butyrat in humanen Magenkarzinomzellen die Proliferation hemmt und vermehrt Apoptose induziert. Die Expression von c-jun und Bcl-xS wurde durch Butyrat gesteigert, während c-myc vermindert exprimiert wurde [58]. Litvak et al. konnten an einer weiteren Zelllinie die proliferationshemmende und Apoptose-induzierende Wirkung von Butyrat bestätigen und wiesen eine vermehrte Expression von Zellzyklusregulatoren (p21Waf1/Cip1 und p27/Kip1) und pro-apoptotischen Proteinen (Bax, Bak und Bik) nach Inkubation mit Butyrat nach [59].

Neben den beschriebenen Wirkungen von Butyrat auf Proteinebene beeinflusst Butyrat auch die Struktur und Funktion des Chromatins. So bewirkt Butyrat über eine nichtkompetitive und reversible Hemmung von Histondeacetylasen (HDACs) [60] eine Hyperacetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen im Zellkern [61]. Acetylierung und Deacetylierung von Histonen werden über Histonacetylasen bzw. Histondeacetylasen katalysiert [62]. Der Grad der Histonacetylierung beeinflusst über strukturelle Veränderungen des Chromatins die Expression verschiedener Gene, gleiches gilt wahrscheinlich auch für zusätzliche strukturelle Chromatinbestandteile wie die HMG-Proteine. In den letzten Jahren wurden zunehmend die Auswirkungen einer Histonhyper- bzw. -hypoacetylierung untersucht, nachdem einige Studien einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Histonacetylierung und der Karzinogenese aufzeigten [63]. Ein spezifischer Hemmstoff der Histondeacetylasen ist Trichostatin A

(TSA), ein Fungizid, welches keine strukturelle Ähnlichkeit mit Butyrat aufweist [64]. TSA hemmt spezifisch Histondeacetylasen und hat ähnliche Effekte wie Butyrat auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung. TSA moduliert außerdem eine Reihe von Faktoren in ähnlicher Weise wie Butyrat [65] [66]. Dies lässt vermuten, dass die Inhibition der Histondeacetylasen eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Butyratwirkung hat. Über eine Modulation der Chromatinstruktur durch Veränderung des Ausmaßes der Acetylierung von Histonproteinen beeinflusst Butyrat die Expression zahlreicher Gene. Dies könnte dann auch – zumindest teilweise – die Wirkungen von Butyrat auf Proteinebene erklären.

1.4 HMG Proteine

Die „high-mobility-group“ (HMG) Proteine sind eine Familie von Nicht-Histon Proteinen, deren Namensgebung aus ihrem Verhalten bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel resultiert. Sie wurden ursprünglich aus Säugetierzellen isoliert und werden derzeit in drei große Familien eingeteilt: die HMGB (früher HMG-1/-2), die HMGN (früher HMG-14/17) und die HMGA (ursprünglich HMG-I/Y/C) Familie [67] [68]. Jede HMG-Familie besitzt für sie charakteristische funktionelle Elemente: Das der HMGB-Familie ist die sogenannte „HMG-box“, für die HMGA-Familie ist der „AT-hook“ kennzeichnend und die „nucleosomal binding domain“ ist charakteristisch für die HMGN-Familie [69]. Die funktionellen Elemente der einzelnen HMG-Familien sind auch Bestandteil zahlreicher weiterer Kernproteine in verschiedenen Organismen; diese bezeichnet man als „HMG motif proteins“.

HMG-Proteine gelten als wichtige Bestandteile des Chromatins. Sie bewirken strukturelle Veränderungen im Chromatingerüst und erleichtern bzw. ermöglichen zahlreiche DNA-abhängige Prozesse, wie Transkription, Replikation sowie Rekombination und DNA-Reparatur [69].

Entscheidend für das geregelte Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus und für den Ablauf DNA-abhängiger Prozesse sind die Chromatinstruktur und die Zugänglichkeit der Nukleosomen für die vielfältigen Regulationsfaktoren. Die Nukleosomen stellen die

unterste Organisationsebene des Chromatins dar: Sie bestehen aus dem Nucleosomecore, einem Oktamer aus 4 Dimeren der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4; um dieses windet sich die DNA in einer Länge von 147 Basenpaaren. Die Nucleosomenpartikel sind repetitive Elemente und werden durch Histon H1 „verschlossen“; zwischen zwei Nucleosomenpartikeln befindet sich die sogenannte „linker DNA“, welche eine Länge von ca. 50 bis 60 Basenpaaren besitzt [70].

Chromatinstruktur und -komprimierungsgrad sind dynamisch und beeinflussen die genannten Funktionen: ein hoher Komprimierungsgrad behindert den Zugang zu den Nucleosomen und hemmt genomische Prozesse, während eine Öffnung der Chromatinstruktur mit einer Aktivierung vielfältiger Gene verbunden ist.

Im Zellkern gibt es eine Reihe von Prozessen, welche die Nucleosomen reversibel modifizieren können. Dazu gehören Histonkinasen, Histonmethylasen, Histonacetylasen und -deacetylasen sowie DNA-Methylasen und „nucleosome-remodeling complexes“ [71] [72] [73] [74] [75]. Daneben existieren im Zellkern weitere Proteine – wie die HMG-Proteine –, welche an die DNA und die Nucleosomen binden und strukturelle Veränderungen bewirken können [69].

1.4.1 HMGN-Proteine

HMGN-Proteine kommen in allen Säugetierzellen und bei vielen Wirbeltieren, jedoch nicht in allen Eukaryonten vor [69]. Sie sind wahrscheinlich mitverantwortlich für den ordnungsgemäßen Ablauf entscheidender Zellfunktionen. Verteilung und Menge der HMGN-Proteine variieren abhängig von externen Einflüssen und vom Entwicklungsstand. Wahrscheinlich sind nicht alle der bekannten Funktionen der HMGN-Proteine wichtig für das Überleben der Zelle, jedoch beeinträchtigt eine abnormale Expression dieser Proteine oder das Fehlen eines der HMGN-Proteine die normale Entwicklung und den Zellphänotyp. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass das Gen von HMGN1 auf der Region 21q22.3 lokalisiert ist [76]. Diese Region ist auch mit der Pathogenese der Trisomie 21 assoziiert. In Mäuseembryonen mit der numerischen Chromosomenaberration Trisomie 16, welche als Tiermodell für die humane Trisomie 21 gilt, wird HMGN1 vermehrt exprimiert. Möglicherweise ist HMGN1 ein weiterer Faktor in der Ätiologie des Down-Syndroms. Die HMGN-Proteine sind die bisher einzig bekannten Kernproteine, die spezifisch an die Nucleosomecores binden können [77]. Sie haben ein Molekulargewicht von ca. 10 kDa und besitzen drei entscheidende Funktionselemente: das zweiteilige „nuclear

localization signal“ [78], die Nukleosomen-Bindungs-Domäne (NBD) [79] [80] und die Chromatinentfaltungsdomäne (CHUD) [81]. Die Nukleosomen-Bindungs-Domäne ist kennzeichnend für die HMGN-Proteine; es ist ein Abschnitt von 30 Aminosäuren, der überwiegend positiv geladen ist. Die Bindung der HMGN-Proteine an die Nukleosomen verringert den Grad der Chromatinkomprimierung, erhöht die Zugänglichkeit der nukleosomalen DNA und erleichtert bzw. beschleunigt Transkription und Replikation [82]. Die Bindung der HMGN-Proteine an die Nukleosomen führt über Interaktion mit Histon H1 und den N-Terminus der Kernhistone zu einer Öffnung der Chromatinstruktur [83]. Dabei sind die HMGN-Proteine nicht dauerhaft mit dem Chromatin assoziiert, sondern bewegen sich als Bestandteil von Multiproteinkomplexen durch den Zellkern. Die Verteilung der HMGN-Proteine im Zellkern ist dynamisch [84] und wird durch posttranslationale Modifikation beeinflusst. Dazu gehören vor allem Phosphorylierung [85] [86] und Acetylierung [87] [88]. Metabolische Prozesse und das Stadium des Zellzyklus beeinflussen die Verteilung der HMGN-Proteine; so sind die HMGN-Proteine während der Mitose von den Nukleosomen gelöst [78].

1.4.2 HMGA-Proteine

Die HMGA Familie besteht derzeit aus vier bekannten Mitgliedern: HMGA1a, HMGA1b und HMGA1c sowie HMGA2. Die HMGA1 a, b, und c Proteine werden von unterschiedlichen Splicingvarianten des HMGA1-Gen-Transkriptes gebildet. Der Genlocus für HMGA1 liegt beim Menschen auf Chromosom 6p21. HMGA2 wird durch ein separates Gen codiert, das beim Menschen auf Chromosom 12q14-15 gelegen ist [89].

Gemeinsames Merkmal der verschiedenen HMGA-Proteine ist das Vorhandensein des so genannten „AT-hook“, eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne. Jedes HMGA-Protein besitzt drei ähnliche „AT-hooks“; diese bestehen aus einem invarianten „core motif“ mit palindromischer Peptidsequenz (Pro-Arg-Gly-Arg-Pro), welches von anderen, ebenfalls konservierten Aminosäureabschnitten flankiert wird. Über diesen „AT-hook“ binden HMGA-Proteine an AT-reiche DNA Abschnitte, wobei eher die Struktur der DNA von Bedeutung ist, als die zugrunde liegende Nukleotidsequenz.

Die HMGA-Proteine beeinflussen die Transkription verschiedener Gene, wobei teilweise die Transkription erleichtert, teilweise gehemmt wird. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die HMGA-Proteine als architekturelle Transkriptionsfaktoren die

Formation von Multiproteinkomplexen (so genannte „enhancesome“) im Bereich AT-reicher DNA-Abschnitte an der Promotorregion der entsprechenden Gene kontrollieren [90].

Die transkriptionssteigernde Eigenschaft von HMGA-Proteinen kann teilweise durch eine „Öffnung“ der Chromatinstruktur erklärt werden. HMGA-Proteine könnten im Bereich AT-reicher DNA-Abschnitte repressive Proteine, wie beispielsweise Histon H1, verdrängen und so eine Chromatinstruktur induzieren, welche die Transkription erleichtert [91].

HMGA-Proteine unterliegen verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung. Folgen dieser Modifikationen sind veränderte Bindungsaffinitäten der HMGA-Proteine zu ihren Substraten [92]. Diese Modifikationen sind abhängig von Zellzyklus und exogenen Einflüssen und werden über unterschiedliche Kaskaden vermittelt. Über die funktionellen Auswirkungen dieser posttranslationalen Modifikationen ist derzeit jedoch noch wenig bekannt [89].

HMGA-Proteine werden in ausdifferenzierten, nicht-proliferierenden Zellen und Geweben nahezu nicht exprimiert [93], während eine sehr hohe Expression während der Embryonalentwicklung und in rasch proliferierenden Zellen zu finden ist.

Giancotti und Mitarbeiter zeigten, dass HMGA1 in verschiedenen Malignomen der Maus im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert wird [94]. Mittlerweile wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Überexpression von HMGA1 in vielen malignen Tumoren nachgewiesen, und zwar sowohl in Karzinomzelllinien menschlichen und tierischen Ursprungs, in Biopsie- und Operationspräparaten als auch in künstlich erzeugten Karzinomen im Tierversuch. Eine Überexpression von HMGA1 ist in Prostatakarzinomen [95], Schilddrüsenkarzinomen [96], verschiedenen malignen Läsionen des Pankreas [97, 98], Zervixkarzinomen [99] und in Tumoren des ZNS [100] sowie in Magenkarzinomen [101] nachweisbar. In vielen Untersuchungen konnte eine Korrelation zwischen Ausmaß der HMGA1-Überexpression und dem Malignitätsgrad festgestellt werden. So konnten Abe und Mitarbeiter eine HMGA1 Überexpression in invasiven Pankreaskarzinomen nachweisen, während nicht-invasive Karzinome und Karzinome *in situ* keine erhöhten HMGA1-Spiegel aufwiesen [97, 98]. Auch Neuroblastome weisen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad ein unterschiedliches Ausmaß der HMGA1-Überexpression auf [100]. Im Tierversuch erzeugten Rajeswari und Mitarbeiter durch Benzopyren-Behandlung bei Mäusen Hautkarzinome und fanden ebenfalls erhöhte HMGA1-Proteinspiegel, wobei sie eine Korrelation zwischen Ausmaß

der HMGA1-Überexpression und dem Ausmaß der zellulären Atypien aufzeigen konnten [102]. Eine fehlerhafte Regulation der HMGA1-Expression ist jedoch nicht nur auf Karzinome beschränkt, sondern auch in vielen benignen mesenchymalen Tumoren zu finden [103] [104].

Die Art und Weise, wie HMGA-Proteine im Prozess der malignen Transformation agieren, ist noch nicht hinreichend geklärt. Bekannt ist jedoch, dass HMGA-Proteine die Expression zahlreicher, für die Tumorprogression entscheidender Gene beeinflussen. Mittlerweile werden die HMGA-Proteine auch als neue Familie von Onkogenen angesehen [105].

Die Arbeitsgruppe um Takaha konnte kürzlich einen weiteren potentiellen Wirkmechanismus von HMGA1 in der Genese verschiedener Malignome aufzeigen [106]. So sind unbalancierte Chromosomentranslokationen häufig in soliden menschlichen Tumoren zu finden. In verschiedenen menschlichen Prostatakarzinomzelllinien korrelierte das Ausmaß der Chromosomentranslokationen positiv mit der Überexpression von HMGA1. Takaha und Mitarbeiter konnten durch Überexpression von HMGA1a in einer Zelllinie mit stabilem Karyotyp und nur balancierten Translokationen zahlreiche neue unbalancierte (non-reziproke) und heterogene Translokationen erzeugen. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass HMGA1 eine wichtige Rolle in der Entstehung chromosomaler Translokationen hat, welche häufig in benignen und malignen Neoplasien zu finden sind.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Butyrat hat *in vitro* und *in vivo* vielfältige Wirkungen auf maligne transformierte Zellen und in den letzten Jahren sind bereits zahlreiche Erkenntnisse erlangt worden, auf welche Weise diese Wirkungen vermittelt werden. Lange suchte man nach dem „butyrate-response-element“; dem zentralen Element, welches die vielfältigen Wirkungen Butyrats vermittelt. Doch haben die Forschungsergebnisse bis jetzt noch nicht ein solches zentrales Element nachweisen können. Vielmehr beeinflusst Butyrat – wahrscheinlich über unterschiedliche Mechanismen – vielfältige zelluläre Funktionen. Bisher wurden die vielfältigen Wirkungen von Butyrat auf Proteinebene untersucht und es konnte die Modulation von zentralen Regulatoren des Zellzyklus, der Differenzierung und der Apoptose gefunden werden. Wie diese Wirkungen auf chromosomaler Ebene vermittelt werden, ist noch weitgehend unklar.

Butyrat verstärkt die Acetylierung von Histonen im Zellkern. Dieser Prozess ist mit der Bildung von aktivem Chromatin und gesteigerter Genexpression verknüpft. An der Bildung von transkriptionell aktivem Chromatin sind jedoch auch weitere Komponenten beteiligt. Hierzu zählen die „High-mobility-group“- Proteine, welche die Chromatinstruktur und infolgedessen DNA-abhängige Prozesse beeinflussen. Posttranslationale Modifikationen dieser HMG-Proteine führen wiederum zu geänderten Bindungseigenschaften an Chromatinstrukturen. Die Modulation der Expression und posttranslationale Modifikation dieser HMG-Proteine durch Butyrat könnten zum Teil für die vielen mit Butyrat in Zusammenhang stehenden Wirkungen verantwortlich sein. Ziel dieser Arbeit war zunächst die Etablierung eines nicht-radioaktiven Northern-Blot-Verfahrens zur mRNA-Expressionsuntersuchung. Zunächst wurde die Basisexpression der HMG Proteine HMGA1 und HMGN1 und -N2 in den entsprechenden Zelllinien untersucht. Nach Inkubation humaner Kolon- und Magenkarzinomzelllinien mit Butyrat und Trichostatin A sollte die Modulation der Genexpression der HMG-Proteine -N1/N2 und -A1 untersucht werden. Besonders von Interesse war die Modulation der Expression von HMGA1, da dieses Protein in zahlreichen humanen Malignomen überexprimiert wird und mittlerweile selbst als Onkogen angesehen wird.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Fedegari, Italien
Brutschrank B5060	Hereus, Hanau
Easy-cast Horizontal Electrophoresis System 7x8 cm	MWG-Biotech, Eberberg
Gefrierschrank:	
-70°C	Thermo forma, Marietta OH, USA
-20°C	Bosch, Stuttgart
Mikroskop Leitz DM IL	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Philips, Hamburg
Neubauerzählerkammer Bright Line 10µl	Schott Glas, Mainz
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipettboy acu	Integra Bioscience, Fernwald
Power Supply EC-Apparatus EC 140	EC-Apparatus Co., Holbrook NY, USA
Quarzküvette 100 µl	Hellma, Müllheim
Rüttler IKA-Vibrax-VXR	Janke & Kunkel, Staufen
Sterilwerkbank Gelaire BSB 4	Bioflow Technik, Meckenheim
UV Tisch TI3 (312 nm)	Biometra, Göttingen
Videodokumentationssystem Biometra	Biometra, Göttingen
Vortexer „Vortex Genie 2“	Bender & Hohbein, Zürich, CH
Waage	Sauter, Albstadt-Ebingen
Analysenwaage	Mettler Toledo, Gießen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen	
Labofuge 400R	Kendro, Hanau
Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg

Hettich 2020	Hettich, Tuttlingen
Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier GB 002	Schleicher & Schnell, Keene NH, USA
Nylon Membranen	Roche, Mannheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	
1,7 ml Safe Seal Microcentrifuge Tubes	Sörenso Bio Science, West Salt Lake City, USA
15 ml, 50 ml	Falcon, Heidelberg
Kulturflaschen (25, 75 cm ²)	Costar, Cambridge, USA

2.1.3 Chemikalien-Zusammensetzungen

DIG Easy Hyb Granules	Roche, Mannheim
peqGold TriFast TM	Peqlab, Erlangen
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim

2.1.4 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Roche, Mannheim
------------------------------------	-----------------

2.1.5 Chemikalien und Enzyme

Agarose	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA Fraktion V	Boehringer, Mannheim
Butyrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BCIP (5-Chlor-4-chlor-3-indolylphosphat, Toluidinisalz)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfonyloxid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA 0,5 M pH 8,0	Gibco BRL, Eggenstein
Ethanol	J.T. Baker, VA Deuter, NL
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Bovines Serum (FBS)	Life Technologies, Paisly, UK
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hepes Buffer	Life Technologies, Paisly, UK
L-Glutamin	Life Technologies, Paisly, UK
Minimal Essential Medium	Life, Technologies, Paisly, UK
MOPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
Non Essentiell Amino Acids	Life, Technologies, Paisly, UK
NTB (Nitro-blau-Tetrazoliumchlorid)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	Life, Technologies, Paisly, UK
Penicillin/Streptomycin	Life, Technologies, Paisly, UK
RPMI 1640 Medium	Life, Technologies, Paisly, UK
SDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sodiumacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Life Technologies, Paisly, UK
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Ansatz der Zellkulturversuche

Für die Northern-Blot-Untersuchungen wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen je 75 cm^2 Kulturflasche ausgesät und anschließend für 72 h in 20 ml Inkubationsmedium kultiviert. Zur Synchronisation des Zellwachstums erfolgte nach 72-stündiger Inkubation die Entfernung des 10% FBS-Mediums und Inkubation mit serumfreiem Medium für 6 Stunden. Anschließend wurden die Zellen wieder für 12 Stunden im o.g. Inkubationsmedium inkubiert. Im nächsten Arbeitsgang erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen Butyrat (2-4mM) und TSA (500ng/ml). Butyrat wurde in ddH₂O gelöst, TSA in DMSO. Zur Kontrolle erfolgte die Inkubation mit Inkubationsmedium bzw. Inkubationsmedium und DMSO. Für die Northern-Blot Untersuchungen wurden Inkubationszeiten von 0, 8, 24 und 48 Stunden gewählt.

2.2.2 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde das gebrauchsfertige Reagenz peqGold TriFast™ (TriFast) der Firma peqlab (Erlangen) verwendet. TriFast besteht aus einer einphasigen Phenol- und Guanidinisothiocyanatlösung. Diese Methode der RNA-Isolierung basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die RNA-Isolierung direkt aus der Zellkulturflasche erfolgen und somit der Arbeitsschritt der Zellaufbereitung entfallen kann.

Insgesamt besteht diese Methode der RNA-Isolierung aus fünf Arbeitsschritten: Homogenisieren der Probe, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen und Lösen der RNA.

Zur Isolierung wurde nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit das Zellkulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und bei 4°C und 900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde TriFast direkt in die Zellkulturflaschen, bzw. die Zentrifugenröhrchen gegeben und zwar 4 ml für die großen 75 cm^2 Kulturflaschen und 1ml TriFast in die Zentrifugenröhrchen. TriFast löst die Zellen direkt von der Zellkulturflasche ab und lysiert sie. Anschließend wird die Lösung in Portionen zu einem Milliliter in 1,7ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu erreichen.

Zu jeder Probe wird zur Phasentrennung pro 1ml eingesetztem TriFast 0,2 ml Chloroform zugegeben und anschließend für fünfzehn Sekunden durch Vortexen gut vermischt. Die Proben werden dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im folgenden für 5 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Man erhält eine Auftrennung der Probe in drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine wässrige Phase, in welcher sich die RNA befindet.

Die wässrige Phase wird nun vorsichtig abgenommen und in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Im nächsten Arbeitsgang erfolgt die Präzipitation der RNA durch Isopropanolfällung. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter TriFast werden die Proben mittels Vortexen gut gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Man erhält nun ein RNA-Präzipitat von gelartiger Konsistenz am Boden des Zentrifugenröhrchens.

Das RNA-Pellet wird zweimal mit 75-%igem Ethanol durch Vortexen und Zentrifugation für zehn Minuten bei 12.000 x g und 4°C gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wird der Ethanolüberstand verworfen und das Pellet kurz an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgt das Lösen des RNA-Pellets in 15 µl DEPC-Wasser. Die RNA kann anschließend bei – 20 °C eingefroren werden.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgt durch photometrische Messung in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von 1 entspricht bei dieser Wellenlänge etwa einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Zur Beurteilung einer eventuellen Kontamination mit DNA erfolgte ebenfalls eine Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der $E_{260/280}$ Quotient gibt Aufschluß über die Reinheit der isolierten RNA und sollte etwa zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

2.2.3 Northern Blotting

Elektrophorese

10x Elektrophoresepuffer:	Natriumacetat 50 mM
	EDTA 10 mM
	MOPS 200 mM
	in DEPC-H ₂ O
	pH 7,0

RNA-Probenpuffer:	16 µl gesättigte Bromphenolblaulösung 4 ml 10x Elektrophoresepuffer 3,084 ml Formamid 2 ml Glycerol (100%) 720 µl Formaldehyd (37 %) 80 µl 500mM EDTA, pH 8,0 ad 10 ml DEPC-H ₂ O
1% Formaldehyd-/Agarosegel für 40 ml:	Agarose: 0,4 g 4 ml 10x Elektrophoresepuffer in DEPC-H ₂ O in Mikrowelle lösen, nach Abkühlen auf ca. 65 °C: 2,2 ml Formaldehyd (37 %) 0,5 µg/ml Ethidiumbromid
20x SSC:	NaCl 175 g Natriumcitrat 88,2 g ad 1 l DEPC-H ₂ O pH 7,0
20 % SDS:	200g SDS ad 1 l DEPC-H ₂ O bei 65°C lösen

Die Auftrennung der RNA erfolgt durch Elektrophorese in denaturierendem 1%igem Formaldehydgel. Pro Spur werden 15µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die entsprechende Menge wird von der RNA-Lösung abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 15µl aufgefüllt. Anschließend werden 5µl Probenpuffer hinzugegeben, die Proben für fünf Minuten bei 70°C im Wasserbad denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Das zwischenzeitlich vorbereitete 1%ige Formaldehydgel wird in eine Elektrophoresekammer gegeben und diese mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt. Pro Spur werden nun 20 µl Probenvolumen geladen und anschließend die Elektrophorese bei 100 Volt für eine Stunde durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgt die Kontrolle des RNA-Zustandes und der gleichmäßigen Beladung aller Spuren unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm. Die RNA-Banden lassen sich bei dieser Wellenlänge durch Interaktion von Ethidiumbromid mit der RNA visualisieren. Als Gütekriterium für den RNA-Zustand wurde der klare Nachweis der 28S und 18S Untereinheiten der ribosomalen RNA

festgelegt. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter Zuhilfenahme eines Videodokumentationssystems. Vor dem Blotting des Gels wird dieses für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur in 2x SSC Lösung gewaschen.

Northern-Blotting

Der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgt mittels einseitig gerichtetem Kapillarblotting. Im Kapillarblot-Verfahren werden RNA-Fragmente mit Hilfe der Kapillarwirkung eines Flüssigkeitsstromes durch das Gel hindurch auf eine Nylonmembran transferiert und binden an diese. Als Transferlösung wird 20 x SSC verwendet. Der Blotaufbau ist in Abbildung (1) skizziert.

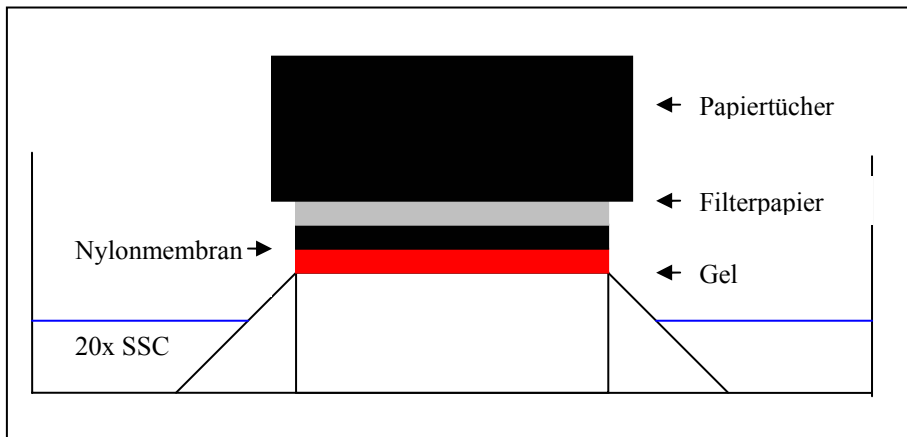


Abbildung 1: Blotaufbau Northern-Blotting

Der Transfer wird mindestens für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wird die Membran in 2x SSC kurz gespült und die RNA mittels UV-Crosslinking ($\lambda = 312 \text{ nm}$ für 5 Minuten) an die Membran fixiert. Die Membran kann anschließend sofort weiterverwendet oder auch getrocknet und anschließend für den späteren Gebrauch aufbewahrt werden.

Hybridisierung

Für Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran wird eine Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb Granules) der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Diese wird entsprechend den Angaben des Herstellers aufgelöst. Für die Prähybridisierung werden 10 ml Hybridisierungslösung mit der zu untersuchenden Membran in eine verschließbare Plastikschaale gefüllt und bei 55°C für eine Stunde im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Für die Hybridisierung werden 2 μl Digoxigenin-

markierter DNA Probe in 10 ml Hybridisierungslösung pipettiert und anschließend für 5 Minuten bei 95°C im Wasserbad denaturiert. Die verwendeten Sonden sind spezifisch für HMGA1, HMGN1 und HMGN2 und wurden von Herrn Dr. Hock, Biozentrum der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Die Prähybridisierungslösung wird dekantiert und für weitere Prähybridisierungen im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Hybridisierungslösung wird zur Membran gegeben und die Hybridisierung bei 55°C im Wasserbad über Nacht durchgeführt. Die Membran wird anschließend zweimalig für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC/0,1 % SDS, dann für eine Stunde bei 55°C in 0,5x SSC/1 % SDS gewaschen.

Detektion

Puffer 1: Tris/HCl 0,1 M
 NaCl 0,15 M
 pH 7,5

Puffer 2: Blockingreagenz 1 % in Puffer 1 pH 7,5

Puffer 3: Tris-HCL 0,1 M
 NaCl 0,1 M
 pH 9,5

NBT-Lösung: NBT 75 mg/ml in 70% Dimethylformamid

BCIP-Lösung: BCIP 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid

Die Detektion der gebundenen Sonden erfolgt mittels Anti-Digoxigenin-AP Antikörper der Firma Roche (Mannheim). Hierzu wird die Membran kurz im Puffer 1 gespült und anschließend für 30 Minuten im Puffer 2 abgesättigt. Der Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:5000 in Puffer 1 auf die Membran gegeben und unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimalig für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Puffer 1 gespült.

Die anschließende Detektion wird colorimetrisch mit den chromogenen Substraten NBT und BCIP vorgenommen. Hierzu werden 45 µl NBT-Lösung und 35 µl BCIP-Lösung in 10 ml Puffer 3 gegeben und auf die Membran gegeben. Anschließend wird die

Membran lichtgeschützt und ohne Schütteln in einem verschlossenen Behälter aufbewahrt. Die Farbreaktion beginnt innerhalb einiger Minuten und ist im Allgemeinen nach 12 Stunden abgeschlossen. Ist das Farbsignal stark genug, kann die Farbreaktion durch kurzes Spülen in deionisiertem Wasser gestoppt werden. Die Membran wird anschließend auf Filterpapier abgetropft und noch im feuchten Zustand zur Dokumentation eingescannt.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich der Expression von HMGA1 sowie HMGN1 und HMGN2 in humanen Sw-480 und Sw-620 Adenokarzinomzellen

HMGN1:

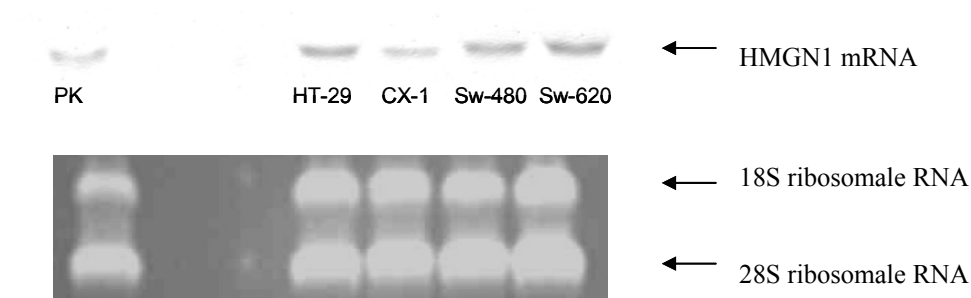


Abbildung 2: Northern-Blot Untersuchung von HMGN1 Genexpression in HT-29, CX-1, Sw-480 und Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK=Positivkontrolle)

In den untersuchten humanen Adenokarzinomzelllinien HT- 29, CX-1, Sw-480 und Sw-620 erfolgt eine basale Expression von HMGN1 mRNA. Signifikante Unterschiede im Vergleich der Primärtumorzelllinie Sw-480 und der Metastasenzelllinie Sw-620 konnten nicht festgestellt werden.

HMGN2:

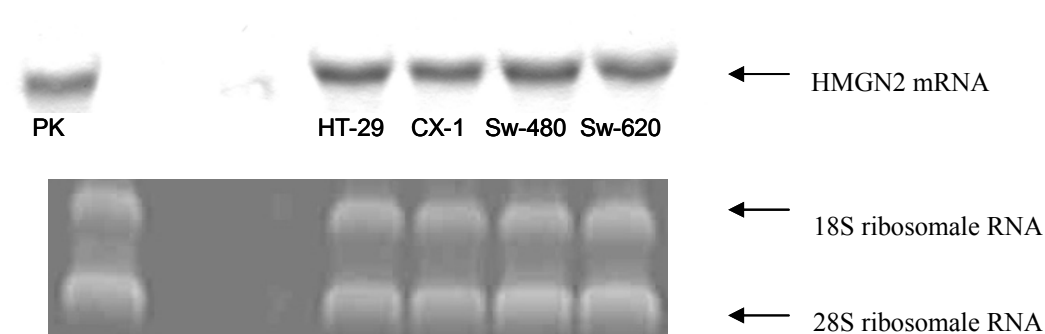


Abbildung 3: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in HT-29, CX-1, Sw-480 und Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK=Positivkontrolle)

Auch HMGN2 mRNA wird in den untersuchten Zelllinien basal exprimiert. Das Ausmaß der Expression war in den verschiedenen Zelllinien vergleichbar.

HMGA1:

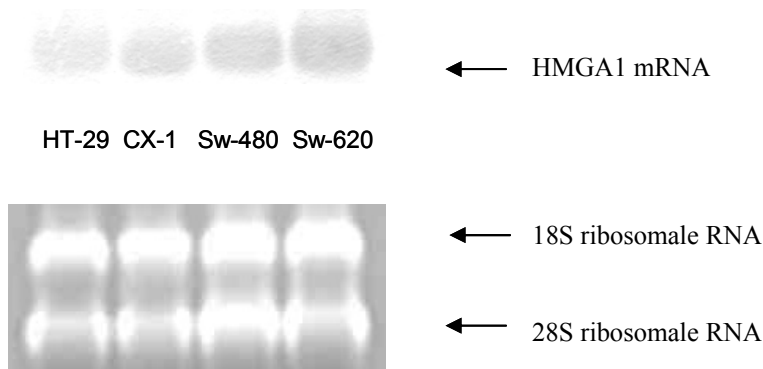


Abbildung 4: Northern-Blot Untersuchung von HMGA1 Genexpression in HT-29, CX-1, Sw-480 und Sw-620 Adenokarzinomzellen

In den untersuchten humanen Adenokarzinomzelllinien HT-29, CX-1, Sw-480 und Sw-620 erfolgt eine Basalexpression von HMGA1 mRNA. Dabei ist in der Metastasenzelllinie Sw-620 im Vergleich zu der Primärtumorzelllinie Sw-480 eine vermehrte Expression von HMGA1 mRNA nachweisbar.

3.2 Ergebnisse der Northern-Blot Untersuchungen in humanen Sw-480 Adenokarzinomzellen

HMGN1:

In unbehandelter humaner Adenokarzinomzelllinie Sw-480 erfolgt eine Basisexpression von HMGN1. Eine 24-stündige Inkubation mit Butyrat in Konzentrationen von 2 und 4 mM führt zu einer Reduktion der mRNA-Expression von HMGN1. (Abbildung 5)

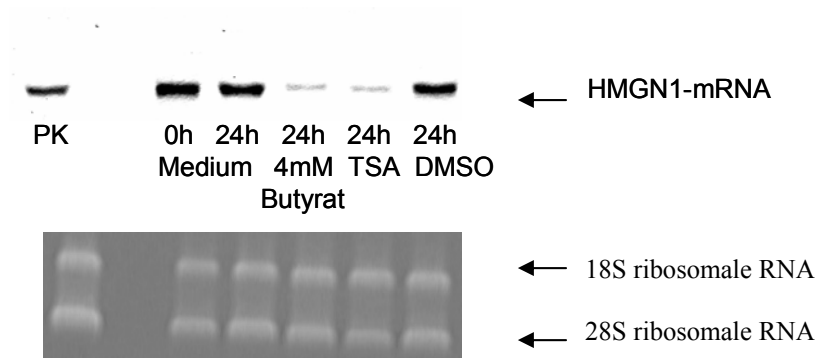


Abbildung 5: Northern-Blot Untersuchung von HMGN1 Genexpression in Sw-480 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle)

Eine Dosisabhängigkeit war bei den verwandten Konzentrationen nicht erkennbar. Auch eine 24-stündige Inkubation mit TSA in einer Konzentration von 500 ng/ml führte zu einer deutlichen Reduktion der mRNA- Expression von HMGN1 im Vergleich zur Mediumkontrolle, wobei TSA im Vergleich zu Butyrat in etwa die gleiche Senkung der mRNA- Expression bewirkte. Eine Inkubation mit DMSO über 24 Stunden hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die mRNA-Expression.

HMGN2:

In unbehandelter humaner Adenokarzinomzelllinie Sw-480 erfolgt eine Basisexpression von HMGN2 (Abbildung 6). Inkubation mit Butyrat führt zu einer zeitabhängigen Reduktion der mRNA-Expression von HMGN2. Eine Inkubation über 8 Stunden hatte keinen Effekt auf die mRNA- Expression von HMGN2. Dieser Effekt trat erstmals nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat auf (Abbildung 6 und 7) und war sowohl bei Butyratkonzentration von 2 mM als auch bei 4 mM nachweisbar.

Auch TSA bewirkt in einer Konzentration von 500 ng/ml nach 24-stündiger Inkubation eine deutlichen Reduktion der mRNA- Expression von HMGN2 im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abbildung 6). Ein wesentlicher Unterschied im Ausmaß der Reduktion von HMGN2 mRNA im Vergleich zwischen Butyrat und TSA konnte nicht festgestellt werden. Inkubation mit DMSO über 24 Stunden hatte keinen Einfluss auf die mRNA- Expression von HMGN2.

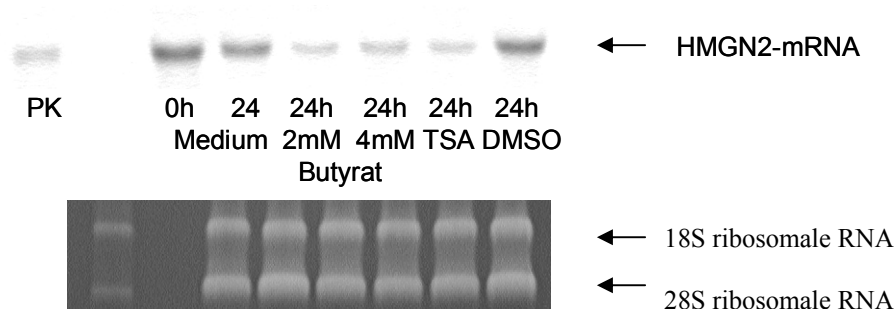


Abbildung 6: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in Sw-480 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

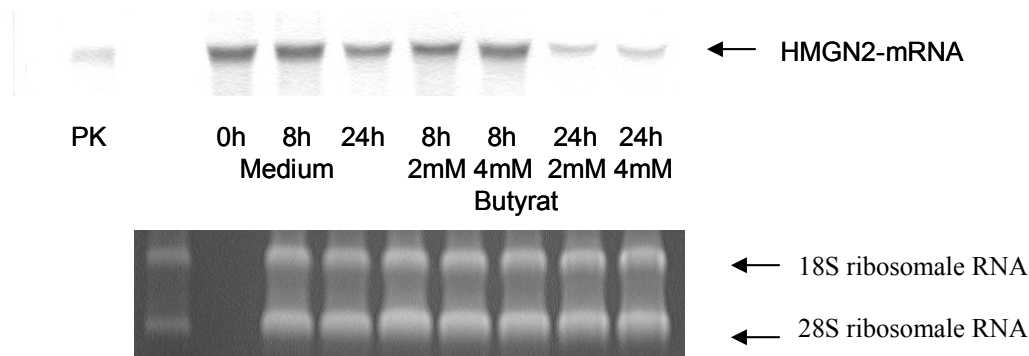


Abbildung 7: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in Sw-480 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

HMGA1a:

In unbehandelter humaner Adenokarzinomzelllinie Sw-480 erfolgt eine Basisexpression von HMGA1. Butyratinkubation in Konzentrationen von 2 und 4 mM führt zu einer deutlichen Reduktion der mRNA Expression von HMGA1a im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit dem Kulturmedium (Abbildung 8).

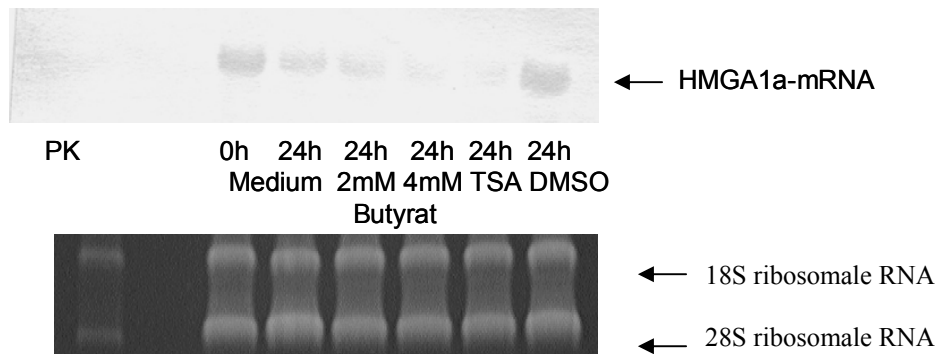


Abbildung 8: Northern-Blot Untersuchung von HMGA1a Genexpression in Sw-480 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

Dieser Effekt trat nach 24 Stunden auf. Dabei war bei Butyrat in Konzentration von 4 mM der Effekt stärker ausgeprägt als bei einer Butyratkonzentration von 2 mM. Auch nach 24-stündiger Inkubation mit TSA in einer Konzentration von 500ng/ml kam es zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1a, wobei keine nennenswerten Unterschiede zu der Butyrat-vermittelten Reduktion der mRNA-Expression bei einer Konzentration von 4 mM nachweisbar waren. Eine Inkubation mit

DMSO über 24 Stunden hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die mRNA- Expression von HMGA1a.

3.3 Ergebnisse der Northern-Blot Untersuchungen in humanen Sw-620 Adenokarzinomzellen

HMGN1:

In unbehandelten Sw-620 Adenokarzinomzellen erfolgt eine Basisexpression von HMGN1 mRNA. Inkubation mit Butyrat führt in der humanen Adenokarzinomzelllinie Sw-620 zu einer zeitabhängigen Reduktion der mRNA-Expression von HMGN1. Eine Reduktion der mRNA-Expression trat erstmals nach 24 stündiger Butyratinkubation bei allen untersuchten Konzentrationen auf. Sowohl Butyratkonzentrationen von 2 mM als auch von 4 mM führten erstmals nach 24 Stunden zu einer Verminderung der HMGN1 mRNA-Expression (Abbildungen 9 und 10).

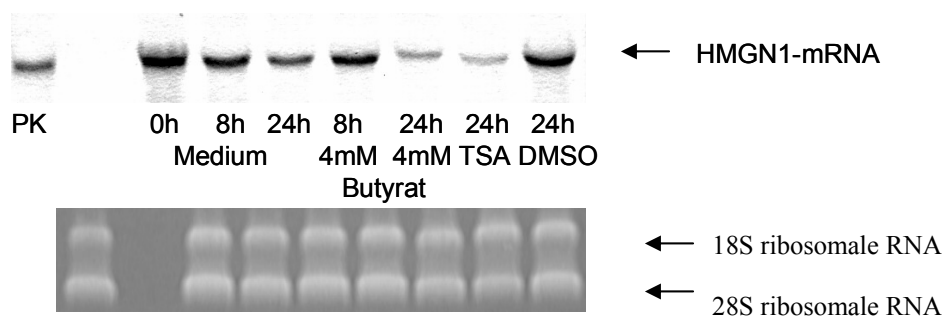


Abbildung 9: Northern-Blot Untersuchung von HMGN1 Genexpression in Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

Auch nach 24-stündiger Inkubation mit TSA in einer Konzentration von 500ng/ml kam es zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-Expression von HMGN1. Dabei war bei einer Butyratkonzentration von 2mM der Effekt von TSA stärker ausgeprägt. Bei einer Butyratkonzentration von 4mM konnten keine Unterschiede zwischen der TSA- und der Butyrat-bewirkten Reduktion der mRNA- Expression von HMGN1 nachgewiesen werden. Eine 24-stündige Inkubation mit DMSO hatte keine Reduktion der mRNA-Expression zur Folge.

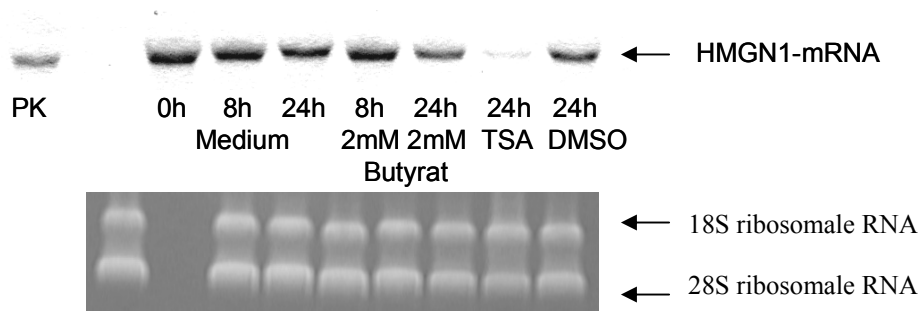


Abbildung 10: Northern-Blot Untersuchung von HMGN1 Genexpression in Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

HMGN2:

HMGN2 mRNA wird in unbehandelten Adenokarzinomzellen Sw-620 exprimiert. Inkubation mit Butyrat führt zu einer zeitabhängigen Reduktion der mRNA-Expression von HMGN2. Dieser Effekt trat erstmals nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat auf (Abbildung 11).

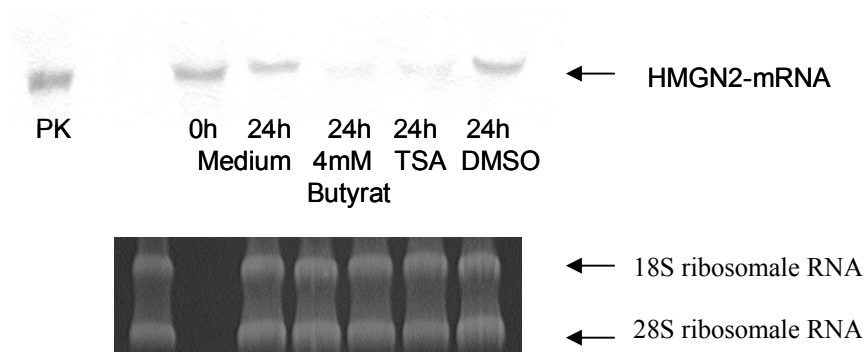


Abbildung 11: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

Sowohl Butyratkonzentrationen von 2 mM als auch von 4 mM bewirkten eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression von HMGN2, wobei die Reduktion der HMGN2-Expression unter Butyratkonzentrationen von 4mM stärker ausgeprägt war (Abbildung 12).

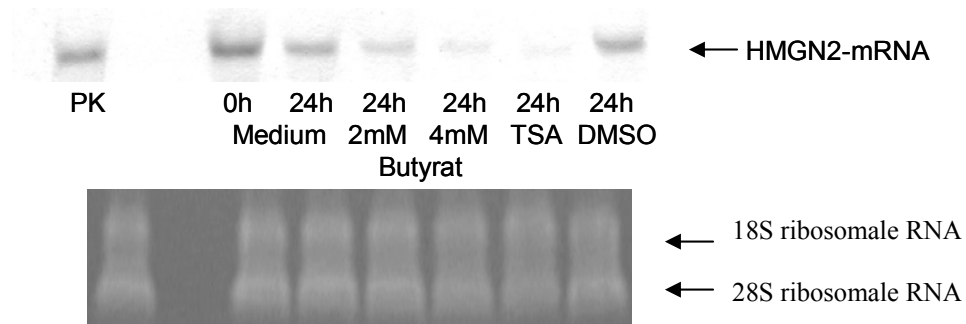


Abbildung 12: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

Auch TSA bewirkt in einer Konzentration von 500 ng/ml nach 24-stündiger Inkubation eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression von HMGN2 im Vergleich zur Mediumkontrolle.

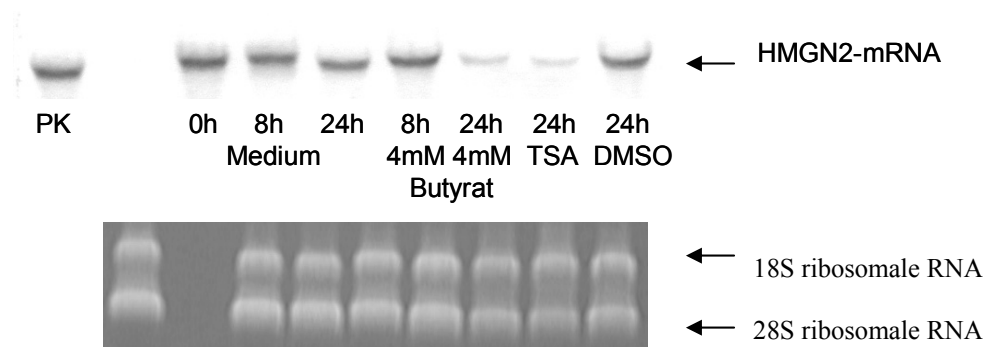


Abbildung 13: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

Bei einer Butyratkonzentration von 4mM konnte kein Unterschied zwischen der TSA- und der Butyratwirkung auf die mRNA- Expression von HMGN2 nachgewiesen werden. Butyratkonzentrationen von 2mM hatten eine etwas geringere Senkung der mRNA- Expression zur Folge (Abbildung 14).



Abbildung 14: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

Eine Inkubation mit DMSO über 24 Stunden hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die mRNA- Expression von HMGN2.

HMGA1a:

In der humanen Adenokarzinomzelllinie Sw-620 erfolgt eine Basisexpression von HMGA1a mRNA. Inkubation mit Butyrat bewirkt eine Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1a im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit dem Kulturmedium. Sowohl Butyrat in Konzentrationen von 2 mM als auch 4 mM führten nach 24-stündiger Inkubation zu einer Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1a; dabei konnte bei den untersuchten Konzentrationen keine Dosisabhängigkeit festgestellt werden (Abbildung 15).

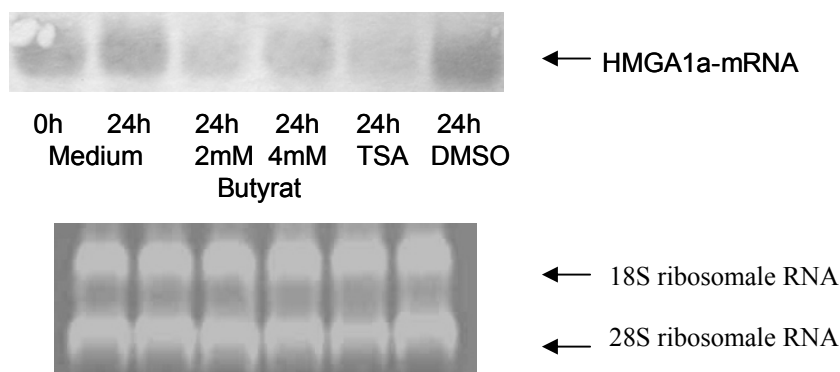


Abbildung 15: Northern-Blot Untersuchung von HMGA1a Genexpression in Sw-620 Adenokarzinomzellen.

Auch nach 24-stündiger Inkubation mit TSA in einer Konzentration von 500ng/ml kam es zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1a, die in etwa im gleichen Maße ausgeprägt war wie nach Inkubation mit Butyrat (Abbildung 16).

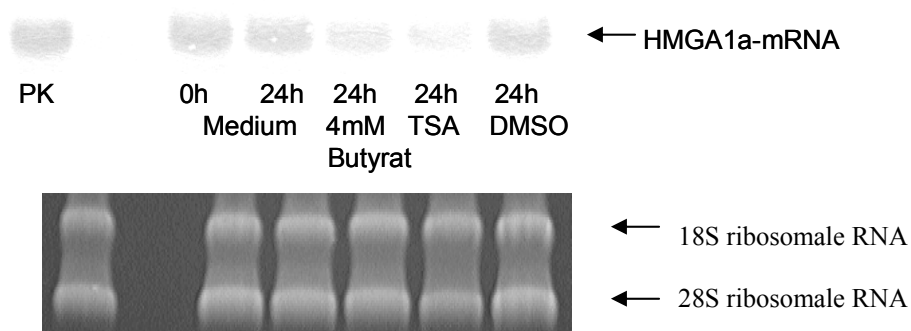


Abbildung 16: Northern-Blot Untersuchung von HMGA1a Genexpression in Sw-620 Adenokarzinomzellen (PK= Positivkontrolle).

Eine 24-stündige Inkubation mit DMSO hatte keine relevante Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1a zur Folge (Abbildung 16).

3.4 Ergebnisse der Northern-Blot Untersuchungen in humanen 23132/87 Magenadenokarzinomzellen

HMGN1:

In der humanen Magenadenokarzinomzelllinie 23132/87 erfolgt eine Basisexpression von HMGN1 mRNA. Inkubation mit Butyrat für 24 Stunden in Konzentrationen von 2 und 4 mM führt zu einer Reduktion der mRNA-Expression von HMGN1 im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit dem Medium. Eine Dosisabhängigkeit konnte nicht nachgewiesen werden. Auch nach einer 24-stündigen Inkubation mit Medium ist die Expression von HMGN1-mRNA im Vergleich zum Ausgangswert vermindert (Abbildung 17).

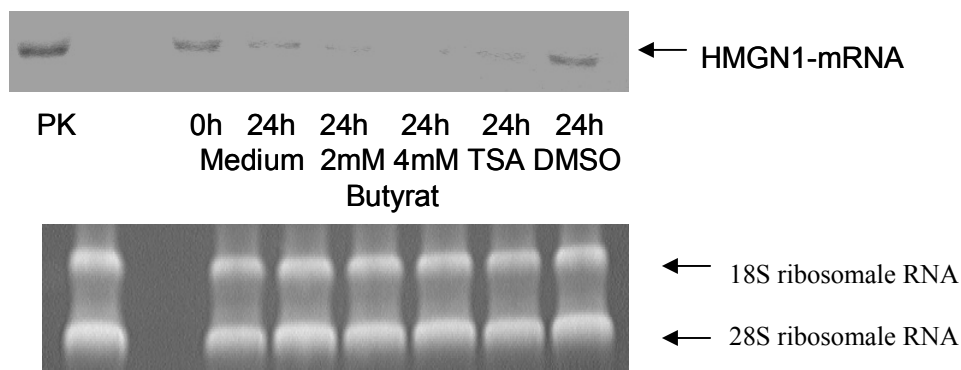


Abbildung 17: Northern-Blot Untersuchung von HMGN1 Genexpression in Magenadenokarzinomzelllinie 23132/87 (PK= Positivkontrolle).

Auch TSA in einer Konzentration von 500 ng/ml bewirkte nach 24 Stunden Inkubation eine Reduktion der HMGN1-mRNA-Expression im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Medium. Das Ausmaß der TSA- bewirkten Reduktion der mRNA- Expression von HMGN1 entsprach dem von Butyrat. Eine 24-stündige Inkubation mit DMSO hatte keine Reduktion der mRNA-Expression von HMGN1 zur Folge.

HMGN2:

HMGN2 mRNA wird in der unbehandelten Magenadenokarzinomzelllinie 23132/87 basal exprimiert. Inkubation mit Butyrat führt zu einer zeitabhängigen Reduktion der mRNA-Expression von HMGN2 (Abbildung 18).

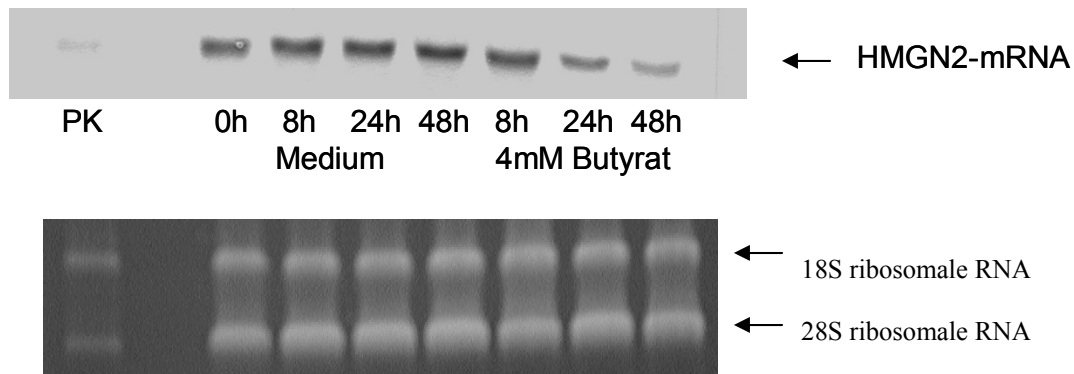


Abbildung 18: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in Magenadenokarzinomzelllinie 23132/87(PK= Positivkontrolle).

Sowohl eine Butyratkonzentration von 2 mM als auch eine Konzentration von 4 mM bewirkten erstmals nach 24-stündiger Inkubation eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression von HMGN2, nach 8-stündiger Inkubation war noch keine Veränderung nachweisbar. Eine Dosisabhängigkeit war bei den untersuchten Konzentrationen nicht erkennbar (Abbildung 19).

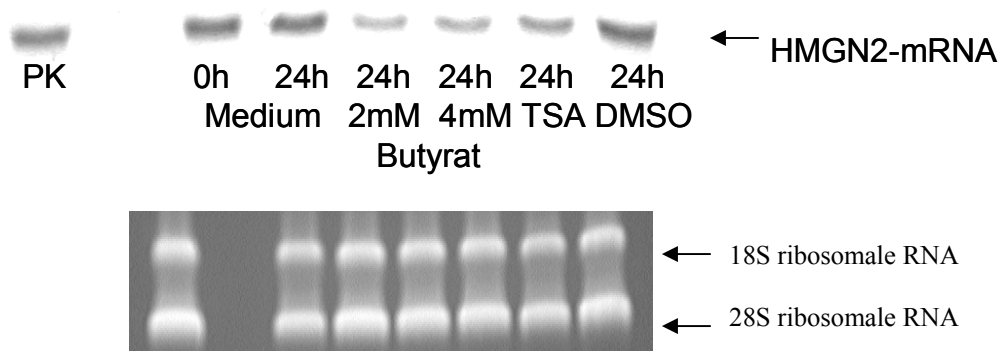


Abbildung 19: Northern-Blot Untersuchung von HMGN2 Genexpression in Magenadenokarzinomzelllinie 23132/87(PK= Positivkontrolle).

Auch TSA in einer Konzentration von 500 ng/ml führt nach 24-stündiger Inkubation zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-Expression von HMGN2 im Vergleich zur Mediumkontrolle. Eine Inkubation mit DMSO über 24 Stunden hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die mRNA-Expression von HMGN2 (Abbildung 19).

HMGA1a:

In der humanen Magenadenokarzinomzelllinie 23132/87 findet sich eine Basalexpression von HMGA1a mRNA. Butyratinkubation führt zu einer deutlichen Reduktion der mRNA- Expression von HMGA1a (Abbildung 20 und 21).

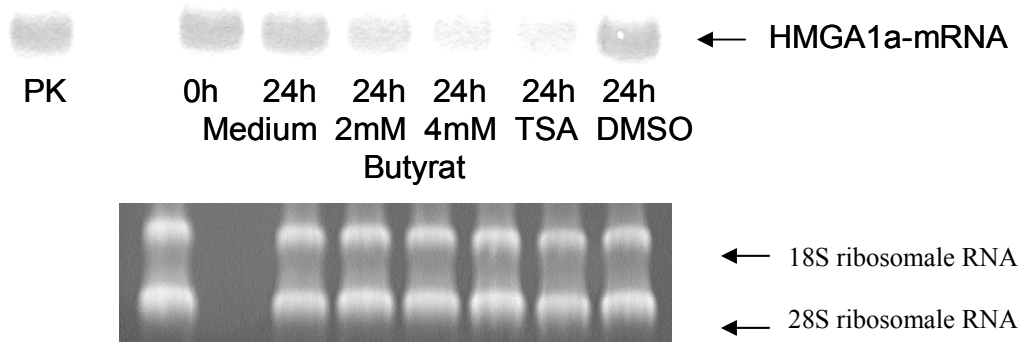


Abbildung 20: Northern-Blot Untersuchung von HMGA1a Genexpression in Magenadenokarzinomzelllinie 23132/87 (PK= Positivkontrolle).

Butyratkonzentrationen von 2 mM und 4 mM bewirkten erstmals nach 24 Stunden eine verminderte Expression der mRNA von HMGA1a. Dabei war der Effekt nach Inkubation mit 4 mM Butyrat stärker ausgeprägt als nach Inkubation mit 2 mM. Auch Inkubation mit TSA (Konzentration 500 ng/ml) bewirkte nach 24 Stunden eine verminderte HMGA1a-mRNA-Expression, wobei diese im gleichem Maße wie bei einer Butyratkonzentration von 4 mM ausgeprägt war (Abbildung 20). Eine 24-stündige Inkubation mit DMSO hatte keinen Einfluss auf die mRNA- Expression von HMGA1a.

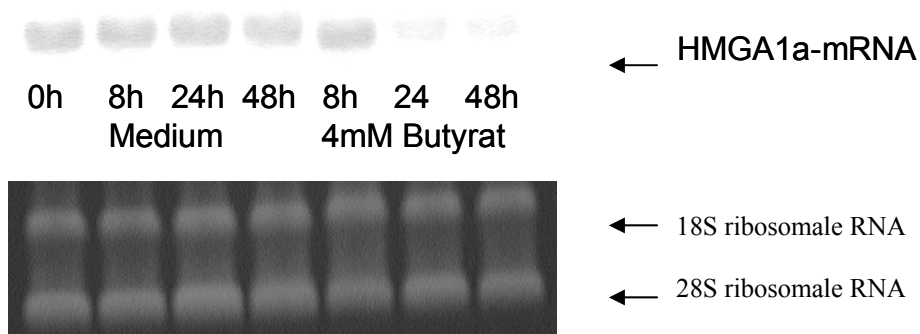


Abbildung 21: Northern-Blot Untersuchung von HMGA1a Genexpression in Magenadenokarzinomzelllinie 23132/87.

4. Diskussion

4.1 Butyrat- und TSA- vermittelte Modulation der mRNA-Expression von HMGA1 in humanen Kolon- und Magenkarzinomzelllinien

4.1.1 Basalexpression von HMGA1 und Modulation der HMGA1-Expression durch Butyrat und TSA

Butyrat hat *in vivo* und *in vitro* vielfältige Wirkungen sowohl auf normale Kolonschleimhaut als auch auf maligne transformierte Kolonozyten. Normalen Kolonozyten dient Butyrat als Hauptenergiequelle und bewirkt Proliferation in den basalen Abschnitten der Kolonkrypten, den physiologischen Proliferationszonen. In maligne transformierten Kolonozyten dagegen hemmt Butyrat die Proliferation, fördert Differenzierung und induziert Apoptose.

Die Fortschritte in der Entwicklung molekularbiologischer und molekulargenetischer Arbeitsmethoden haben es möglich gemacht, eine Vielzahl von Genen zu untersuchen, deren Expression durch Butyrat moduliert wird. Hierzu gehören Regulatoren von Zellwachstum und -differenzierung, Apoptose und wichtige Stoffwechselfunktionen sowie zahlreiche Transkriptionsfaktoren.

Neben der Wirkung von Butyrat auf einzelne Proteine moduliert Butyrat auch die Struktur und Funktion des Chromatins. Butyrat kann über die Vorgänge der Histonhyperacetylierung und Inhibition der Histonphosphorylierung und DNA-Methylierung eine Reihe von strukturellen und funktionellen Vorgängen im Zellkern induzieren. Kernhistone werden an ϵ -Aminogruppen von Lysinresten am N-Terminus acetyliert, wobei Acetylierung und Deacetylierung durch spezifische Enzyme katalysiert werden. Diese sind die Histonacetyltransferasen (HAT) und die Histondeacetylasen (HDAC), welche im Wechselspiel das Ausmaß der Histonacetylierung kontrollieren [62]. Butyrat bewirkt über reversible und nicht-kompetitive Hemmung der Histondeacetylasen [60] eine Hyperacetylierung von Histonproteinen [61]. Histonhyperacetylierung ist mit einer Verminderung des Zellwachstums und mit der Aktivierung verschiedener Gene assoziiert [109]. Weitere von Butyrat modifizierte Chromatinbestandteile sind die HMG-Proteine. Deren posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung beeinflussen die Bindungseigenschaften der HMG-Proteine an das Chromatin und damit dessen Struktur.

Die Nichthistonproteine HMGA1 sind ubiquitäre Proteine, welche eine wichtige Rolle in Zellwachstums- und Differenzierungsvorgängen spielen. Während der Embryonalentwicklung werden sie in hohem Ausmaß exprimiert, nicht jedoch in ausgereiften Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den untersuchten Zelllinien eine Basalexpression von HMGA1 mRNA erfolgt. Dabei war in der Zelllinie Sw-620 im Vergleich zu der Zelllinie Sw-480 eine vermehrte Expression von HMGA1-mRNA in der Northernblot-Untersuchung nachweisbar. Die Zelllinie Sw-620 wurde aus einer Lymphknotenmetastase des Tumors isoliert, aus dem die Zelllinie Sw-480 entstammt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den derzeit vorliegenden Kenntnissen über das Expressionsmuster dieser Proteine. So konnten Fedele et al. 1996 erstmals eine Überexpression von HMGA1 auf Protein- und auf mRNA-Ebene auch in menschlichen kolorektalen Karzinomzelllinien und in Gewebeproben [110] zeigen. In normaler Schleimhaut konnte dagegen kein HMGA1-Protein nachgewiesen werden. Chiapetta und Mitarbeiter untersuchten die HMGA1 Expression in verschiedenen hyperplastischen und neoplastischen Läsionen im Kolorektum [111]. Sie zeigten neben der schon bekannten Überexpression von HMGA1 in Karzinomen auch eine HMGA1 Überexpression in Adenomen. In diesen korreliert das Ausmaß der HMGA1 Überexpression mit der Schwere der zellulären Atypie. Weder in normaler Kolonschleimhaut noch in inflammatorischen oder hamartomatösen Polypen konnte eine HMGA1-Expression nachgewiesen werden.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass Butyrat die mRNA-Expression von HMGA1 in den untersuchten Karzinomzelllinien des Kolons und des Magens vermindert. Sowohl Konzentrationen von 2mM als auch von 4mM führten erstmals nach 24-stündiger Inkubation zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1. In der Magenkarzinomzelllinie 23132/87 und der Kolonkarzinomzelllinie Sw-480 war die Reduktion der mRNA-Expression bei einer Butyratkonzentration von 4mM stärker ausgeprägt als bei einer Konzentration von 2mM. In diesen beiden Zelllinien wird die HMGA1 mRNA Expression durch Butyrat zeit- und dosisabhängig moduliert. In der Zelllinie Sw-620 konnte für die untersuchten Konzentrationen keine Dosisabhängigkeit festgestellt werden.

Auch TSA bewirkt in Konzentrationen von 500ng/ml eine Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1 in den untersuchten Zelllinien, wobei keine relevanten Unterschiede im Ausmaß der Reduktion der HMGA1-mRNA Expression im Vergleich

zu einer Butyratkonzentration von 4mM gefunden wurden. In der Magenkarzinomzelllinie 23132/87 und der Kolonkarzinomzelllinie Sw-480 bewirkte TSA in der untersuchten Konzentration eine stärkere Reduktion der HMGA1 mRNA-Expression als Butyrat in einer Konzentration von 2mM.

Wie Butyrat die Expression von HMGA1 moduliert, ist noch nicht bekannt. Ein möglicher Mechanismus könnte die Modulation der Chromatinstruktur und -funktion durch Butyrat mit nachfolgend veränderter Genexpression sein. Butyrat bewirkt über eine Hemmung von Histondeacetylasen eine Modulation der Chromatinstruktur. Da die gleiche Wirkung auf die HMGA1-Expression durch den spezifischen Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A vermittelt wird, könnte die Hemmung dieser Enzyme der Mechanismus sein, über den Butyrat seine Wirkungen ausübt.

Daneben ist denkbar, dass die Modulation der HMGA1-Expression durch Butyrat auch indirekt über Modulation vorgeschalteter Signalwege vermittelt wird. So ist eine Modulation von c-myc durch Butyrat bereits von einigen Arbeitsgruppen beschrieben worden [112] [113] [114]. Kreth et al. (unveröffentlichte Daten) konnten zeigen, dass eine 24-stündige Butyratinkubation die Expression von c-myc in HT-29 Karzinomzellen senkt.

Die Arbeitsgruppe um Lisa Wood identifizierte HMGA1 als neues Zielgen von c-myc [105], einem Transkriptionsfaktor aus der Familie der myc Onkogene. C-myc ist an der Kontrolle von Zellwachstum, Apoptose und neoplastischer Transformation beteiligt. Aberrante Expression von c-myc spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler humaner Malignome und Überexpression von c-myc ist in einer Vielzahl humaner Malignome, unter anderem dem Kolonkarzinom, zu beobachten. Wood et al. konnten in der Promotorregion des HMGA1-Gens eine Bindungsstelle für c-myc identifizieren und zeigen, dass die HMGA1 Expression durch c-myc stimuliert wird. Erhöhte HMGA1 Proteinspiegel fanden sich ebenfalls in c-myc überexprimierenden Zellen, während in c-myc defizienten Zellen deutlich weniger HMGA1 exprimiert wird.

Denkbar ist, dass Butyrat über seine Wirkung auf c-myc die Expression von HMGA1 in den untersuchten Zelllinien moduliert, d.h. eine Butyrat-vermittelte Reduktion der c-myc Expression hat möglicherweise eine verminderte HMGA1 Expression zur Folge.

HMGA1 Proteine weisen ein großes Maß an posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung auf. Diese Modifikationen sind

in der Lage, die Funktionen der HMGA1 Proteine zu modulieren, beispielsweise im Sinne einer veränderten Substrataffinität. Die HMGA-Proteine gehören zu den am meisten phosphorylierten Proteinen im Zellkern, wobei der Phosphorylierungsgrad in Abhängigkeit von Zellzyklus und äußeren Faktoren schwankt. So wird HMGA-Protein zellzyklusabhängig von der cdc2-Kinase phosphoryliert und ist auch Ziel weiterer Signalkaskaden [92] [91]. Diana und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen, dass ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der HMGA1a Protein Phosphorylierung und dem Ablauf der Apoptose in Leukämiezellen besteht [115]. Ob das Ausmaß der HMGA-Protein-Phosphorylierung in malignen Zellen eine selektive Beeinflussung der Apoptose in diesen Zellen erlaubt, wird in zukünftigen Untersuchungen zu klären sein. Womöglich beeinflusst auch Butyrat den Phosphorylierungsgrad der HMGA-Proteine und damit deren Funktion. Zum derzeitigen Zeitpunkt existieren hierüber keine Daten, so dass weiterführende Untersuchungen notwendig sind.

4.1.2 Auswirkungen der Butyrat- und TSA-vermittelten Modulation der HMGA1-Expression auf die Karzinogenese humaner Malignome

Sowohl Butyrat als auch TSA modulieren die Expression von HMGA1 in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltraktes. Die möglichen Mechanismen, wie Butyrat und TSA diese Modulation bewirken, wurden aufgezeigt. Im Folgenden soll nun auf die Bedeutung einer solchen Modulation der HMGA1 Expression eingegangen werden.

Transfektionsexperimente konnten zeigen, dass Überexpression von HMGA1 und HMGA2 zur neoplastischen Transformation verschiedener Zelllinien (Rat1a Fibroblasten und CB33-Zellen) führt. Umgekehrt verhindert eine Inhibierung der HMGA1 Proteinexpression durch ein Antisensekonstrukt die c-myc ausgelöste Transformation von Burkittlymphomzellen. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse kommen Wood et al. zu dem Schluss, dass die HMGA-Genfamilie selbst als neue Gruppe von Onkogenen angesehen werden kann [105].

Reeves und Mitarbeiter [116] postulieren folgende Möglichkeit, wie es zu einer HMGA1 Überexpression in verschiedenen Malignomen kommen kann: Bekannt ist, dass die Promotorregion des HMGA1-Gens Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und c-myc hat. Weiterhin ist nachgewiesen worden, dass

Mutationen im Bereich von Tumorsuppressorgenen, wie dem APC Gen bei der FAP, zu einer Überexpression von Protoonkogenen, wie dem c-myc, führen kann. Überexpression von c-myc kann wiederum zu einer Überexpression von HMGA1 führen, was schließlich die neoplastische Transformation einer Zelle bewirken kann. Bleibt die Zelle weiterhin mutagenen oder tumorprogressions-fördernden Einflüssen ausgesetzt, könnte über die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1, eine dauerhafte HMGA1 Überexpression resultieren. Denkbar ist, dass die protektiven Effekte von Butyrat in der Karzinogenese auf der Beeinflussung der HMGA1-Expression in diesem kritischen Stadium beruhen.

Dolde et al. zeigten eine Überexpression von HMGA1 in verschiedenen menschlichen Mammakarzinomzelllinien im Vergleich zu einer normalen Mammazelllinie [117]. Hemmung der Proteinexpression von HMGA1 mittels Antisense-ribozyme inhibiert die Transformation der Mammakarzinomzelllinien, während Überexpression von HMGA1a in normalen Mammaepithelzellen deren Transformation bewirkt. HMGA1 wird als relevantes Onkogen in der Karzinogenese des Mammakarzinoms angesehen. Ähnliche Erkenntnisse wurden von Berlingieri und Mitarbeitern bei der Untersuchung an Schilddrüsenzellen gemacht [118]; Hemmung der Proteinexpression von HMGA1 mittels Antisense-cDNA verhindert eine Transformation nach Infektion mit dem Kirsten Murine Sarcoma Virus (KiMSV).

Eine Hemmung der Proteinexpression von HMGA1 verhindert also die maligne Transformation in den untersuchten Zelllinien. Denkbar ist, dass zumindest ein Teil der bekannten protektiven Wirkungen von Butyrat und TSA im Rahmen der Karzinogenese auf einer Reduktion der Expression von HMGA1 beruhen.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig darzustellen, wie HMGA1-Proteine an der Progression maligner Tumore beteiligt sind. Die Arbeiten von Reeves et al. brachten hierzu neue Erkenntnisse [116]. Überexpression von HMGA1-Proteinen in humanen Mammaepithelzellen befähigte diese zur Bildung von Primärtumoren und Metastasen in Nacktmäusen. Interessant ist die Erkenntnis, dass die HMGA1b-Isoform *in vivo* das größere Potential hat, neoplastische Transformation und metastatische Progression hervorzurufen. Weitaus interessanter sind jedoch die Ergebnisse aus Array-Untersuchungen von Transkriptionsprofilen; die beiden HMGA1-Proteine modulieren die Expression einer Vielzahl verschiedener Gene, welche an Signaltransduktion, Zellproliferation, Tumorinitiation, Invasion, Migration, Kolonisation und Induktion der Angiogenese beteiligt sind. Dabei werden eine Reihe von Genen von beiden Isoformen

in gleicher Art und Weise moduliert, wobei aber auch beide Isoformen jede für sich einige Gene individuell beeinflussen. Die beiden Isoformen sind also, obwohl sie sich nur in 11 Aminosäuren unterscheiden, nicht als funktionell-äquivalent anzusehen. Betrachtet man, welche Gene moduliert werden, so fällt auf, dass zahlreiche Gene, die z.B. an Invasion beteiligt sind, vermehrt exprimiert werden, wobei Gene, die beispielsweise für DNA-Reparatur wichtig sind, vermindert exprimiert werden [116].

Eine wichtige Gruppe von Genen, deren Expression von HMGA1 gesteigert wird, ist die der Integrine und ihrer Signaltransduktion. Integrine gehören zu den Schlüsselementen zellulärer Signaltransduktion und sind an der Kontrolle wichtiger Zellfunktionen, wie Zellform und -bewegung, Proliferation und Differenzierung sowie Zelltod beteiligt. Überexpression von Integrinen und die Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden kommen in vielen menschlichen Malignomen vor. Reeves et al. kommen zu dem Schluss, dass die proliferations- und metastasierungssteigernden Wirkungen der HMGA1 Proteine teilweise über eine gesteigerte Expression der Integrine und nachgeschalteter Signalkaskaden vermittelt werden [116].

Butyrat moduliert ebenfalls die Expression von Integrinen. Im cDNA-Array zeigte sich eine Verminderung der mRNA-Expression der Integrin- β 4-Untereinheit. Im Westernblot wurde eine Verminderung der Integrin- β 4-Untereinheit auch auf Proteinebene nachgewiesen (Kreth et al., unveröffentlichte Daten). Die antiproliferative Wirkung von Butyrat auf maligne transformierte Zellen könnte auf einer verminderten Expression der Integrine beruhen. Diese wird möglicherweise über eine Butyrat-vermittelte Reduktion der HMGA1-Expression hervorgerufen.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen lässt sich folgender Zusammenhang zwischen HMGA1-Überexpression in Tumorzellen und den Folgen einer Butyrat-vermittelten Reduktion der HMGA1-Expression herausarbeiten: HMGA1-Überexpression führt zu einer vermehrten Expression von „Invasionsgenen“ und bewirkt damit eine Progression des Tumorwachstums. Hemmung der Expression von HMGA1 mit nachfolgender verminderter Expression dieser „Invasionsgene“ durch Butyrat und TSA führt im Gegenzug zu einer Hemmung des Tumorwachstums. Denkbar ist, dass Butyrat und auch TSA die Expression von HMGA1 in Tumorzellen reduzieren und damit dessen malignes Potential vermindern. Die antikarzinogenen Eigenschaften von Butyrat könnten, zumindest teilweise, durch Expressionshemmung der pro-karzinogenen Überexpression von HMGA1 vermittelt werden.

Da HMGA1 in vielen Malignomen überexprimiert wird und eine Reihe von Genen, deren Expression von HMGA1 moduliert wird, ebenfalls in menschlichen Malignomen überexprimiert werden, betrachten Reeves und Mitarbeiter HMGA1 als einer Art „Master“-Gen, welches weitere Schritte im Rahmen der Karzinogenese beeinflusst [116]. Die vielfältigen Wirkungen von Butyrat auf bereits maligne transformierte Zellen, aber auch die protektiven Wirkungen von Butyrat in der Karzinogenese könnten zumindest teilweise dann auf der Modulation eines solchen „Master“-Genes beruhen.

4.1.3 Modulation der HMGA1-Expression und Funktion als mögliche Therapieform in der Behandlung humaner Malignome

Nachdem gezeigt wurde, dass Überexpression von HMGA1 gemeinsames Merkmal vieler humaner Malignome ist und schon einige potentielle Wirkmechanismen der HMGA1 Proteine in der Karzinomentstehung erläutert wurden, soll im Folgenden auf die möglichen therapeutischen Konsequenzen dieser Erkenntnisse eingegangen werden. In vielen humanen Malignomen verfügt Butyrat über entgegen gesetzte Wirkungen im Vergleich zu HMGA1. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Butyrat eine verminderte HMGA1 Expression bewirkt. Über die mögliche therapeutische Relevanz dieser Erkenntnisse gibt es derzeit in der Literatur keine Aussagen. Denkbar ist, dass Butyrat in Ergänzung zu einer systemischen Chemotherapie eingesetzt werden könnte.

Schon viele Arbeitsgruppen konnten in Zellkulturmodellen zeigen, dass HMGA1-Proteinexpression für die maligne Transformation benötigt wird und Tumorprogression und Metastasierung fördert [105] [119]. Ebenfalls wurde durch Hemmung der HMGA1-Proteinexpression die Transformation verhindert [117] [118] und ein Verlust des metastatischen Potentials herbeigeführt [119]. Viele der Autoren kommen zu dem Schluss, dass HMGA1 als Onkogen ein potentieller Kandidat für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika bzw. neuer Therapiekonzepte in der Therapie humaner Malignome darstellt.

Scala und Mitarbeiter konnten in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien durch Hemmung der HMGA1 Proteinsynthese Apoptose induzieren [120]. Mittels Adenoviren als Vektoren schleusten sie das HMGA1 Gen in antisense Konfiguration in die Zellen ein, was eine verminderte Proteinsynthese in den infizierten Zellen zur Folge hatte. In

den neoplastischen Zelllinien wurde Apoptose induziert, nicht jedoch in normalen Zellen. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass ja auch Butyrat unterschiedliche Auswirkungen auf normale Zellen bzw. maligne transformierte Zellen hat. Möglicherweise kann dieser unterschiedliche Effekt über eine Butyrat-induzierte Reduktion der HMGA1-Expression erklärt werden. Weiterhin untersuchten die Autoren die Auswirkungen einer Adenoviren-vermittelten (Ad-Yas) Synthesehemmung von HMGA1-Protein in bereits existenten Tumoren. Sie konnten eine deutliche Reduktion der Tumorgroße aufweisen. Zusammenfassend kommen die Autoren zu dem Schluss, dass eine Ad-Yas vermittelte Hemmung der HMGA1-Proteinsynthese Grundlage zukünftiger Tumorthherapie sein kann. Von Bedeutung ist vor allem, dass 1. diese Ad-Yas vermittelte Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wirksam war, dass 2. der Effekt in Karzinomzelllinien aus verschiedenen Organen auftrat und dass 3. das Wachstum normaler Zellen nicht beeinflusst wurde.

Yan und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen [121], dass eine Behandlung der Magenkarzinomzelle SGC-7901 mit Tributyrin zu einem verminderten Wachstum und vermehrter Apoptose führte. Tributyrin ist ein neutrales Triglycerid aus kurzkettigen Fettsäuren und ein Pro-Drug von Butyrat. Im Western-Blot zeigten sich unter Tributyrinbehandlung eine verminderte Expression vom Bcl-2 und eine vermehrte Expression von Bax. Von Interesse wäre, inwiefern auch die Expression der HMG-Proteine HMGA1 sowie HMGN1 und HMGN2 bzw. deren posttranslationale Modifikationen von Tributyrin beeinflusst werden.

Aber auch schon bereits vorhandene Medikamente greifen offenbar an den HMGA1 Proteinen an. Beckerbauer et al. zeigten, dass *in vivo* HMGA1-Protein durch das Chemotherapeutikum FR900482 kovalent an die DNA gebunden wird [122]. Die Autoren vermuten, dass die HMGA1 Proteine das Hauptziel dieses Chemotherapeutikums sind. Das FR900482 Chemotherapeutikum ist strukturell mit dem Mitomycin C verwandt, weist aber eine deutlich geringere Toxizität für den Gesamtorganismus auf. Die Entwicklung weiterer Chemotherapeutika, die gezielt an veränderten Zellfunktionen in Tumorzellen, wie z.B. der HMGA1-Überexpression ansetzen, könnte Medikamente hervorbringen, die 1. gegen eine Vielzahl von verschiedenen Malignomen wirken, 2. deutlich effektiver wirken und 3. vor allem weniger systemische Nebenwirkungen besitzen.

Da HMGA1-Proteine wahrscheinlich auch in verschiedenen anderen menschlichen Erkrankungen [123], wie z.B. der HIV Infektion zumindest teilweise eine Rolle spielen

[124], könnten auch in diesen Fällen mögliche Therapiekonzepte auf Grundlage einer Modulation der HMGA1-Proteine entstehen.

Da wir zeigen konnten, dass Butyrat die Expression von HMGA1 in Tumorzellen reduziert, könnte dieser Mechanismus in der Tumorthherapie genutzt werden. Weitere experimentelle *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen werden nötig sein, um zu klären, ob eine Beeinflussung der HMGA1- Expression und –Funktion durch Butyrat als Grundlage neuer Therapiekonzepte möglich sein wird.

4.2 Butyrat- vermittelte Modulation der mRNA-Expression von HMGN1 und N2 in humanen Kolon- und Magenkarzinomzelllinien

HMGN-Proteine sind ubiquitäre Bestandteile der Zellkerne von Säugetieren und stellen wichtige funktionelle Elemente des Chromatins dar, welche die Chromatinstruktur modifizieren können.

Die HMGN-Proteine HMGN1 und HMGN2 werden sowohl in Normalgewebe als auch in maligne transformierten Zellen exprimiert. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien Sw-480, Sw-620 und 23132/87 konnte eine Basalexpression von HMGN1 und HMGN2 gezeigt werden. Signifikante Unterschiede zwischen der Primärtumorzelllinie Sw-480 und der Metastasenzelllinie Sw-620 ließen sich dabei nicht nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass in humanen Kolon- und Magenkarzinomzelllinien Butyratbehandlung mit einer verminderten mRNA-Expression der Nicht-Histon-Proteine HMGN1 und HMGN2 assoziiert ist. Ebenfalls führte die 24-stündige Inkubation mit Trichostatin A, einem Hemmstoff der Histondeacetylasen, zu einer verminderten mRNA-Expression der untersuchten HMGN-Proteine.

Während für die HMGA1-Proteine eine Überexpression in einer Vielzahl von Malignomen bekannt ist bzw. auch ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen HMGA1-Überexpression und Malignomentstehung diskutiert werden kann, ist die Bedeutung der HMGN-Proteine in der Karzinogenese noch unklar. Bis jetzt finden sich nur wenige Untersuchungen, in denen Unterschiede in der Expression der HMGN-Proteine zwischen Normalzellen und maligne transformierten Zellen aufgezeigt werden konnten. Kondos und Mitarbeiter stellten erhöhte Proteinspiegel von HMGN2 in humanen Leukämiezellen im Vergleich zu normalen humanen Leukozyten fest [125]. In der gleichen Arbeit wurden auch erhöhte Proteinspiegel von HMGN2 in

Adenokarzinomen der Mamma und des Intestinums gefunden, jedoch nicht in ebenfalls untersuchten Lungenkarzinomen. Interessanterweise zeigten sich für HMGN1 keine Unterschiede zwischen Normalgewebe und den untersuchten Malignomen. Giancotti dagegen konnte in verschiedenen Malignomen der Maus (Lewis Lungenkarzinom und NQ35 Lymphom) keine Unterschiede in der Expression von HMGN1 und N2 im Vergleich zu Normalgeweben feststellen [94].

Eine Reihe von Arbeitsgruppen beschäftigte sich mit der Rolle der HMGN1- und HMGN2-Proteine in Wachstums- und Differenzierungsvorgängen von normalen, aber auch maligne transformierten Zellen. Lehtonen und Mitarbeiter zeigten, dass HMGN2 im Verlauf der Organogenese unterschiedlich exprimiert wird. So wird HMGN2 mRNA während der Embryogenese stark, in ausdifferenzierten Organen bzw. Geweben vermindert exprimiert. Die Autoren vermuten, dass die vermehrte Expression in sich differenzierenden Zellen eher Ausdruck des Differenzierungsvorganges und nicht proliferationsbedingt ist [126] [127]. Bustin und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkungen einer Überexpression von HMGN1 in transgenen Mäusen [128]. Diese trugen mehrere Kopien humaner HMGN1-Gene in sich, was zu einer Überexpression von humanen HMGN1 zusätzlich zu dem endogen gebildeten murinen HMGN1 führte. Die Auswirkungen auf den Organsimus waren bis auf milde Veränderungen des Phänotyps (erhöhte Inzidenz von Thymuszysten) gering.

In einer späteren Arbeit wurden von der gleichen Arbeitsgruppe die Auswirkungen einer anormalen HMGN1 Expression auf die Differenzierung von Myoblasten zu Myozyten untersucht [129]. Die Überexpression von humanen HMGN1 in murinen Myoblasten verhinderte deren regelrechte Differenzierung. Revertanten, welche die Fähigkeit der Expression von humanem HMGN1 verloren hatten, erlangten die Fähigkeit zur regelrechten Differenzierung zurück.

Auch wenn die genauen Funktionen und Wirkmechanismen der HMGN1 und HMGN2 Proteine noch nicht bekannt sind, so scheinen sie doch eine wichtige Rolle in Wachstums- und Differenzierungsvorgängen zu haben. Eine aberrante Expression beeinflusst wahrscheinlich nicht grundsätzlich die Überlebensfähigkeit der Zelle, jedoch scheint eine geordnete HMGN-Expression für die regelrechte Entwicklung der Zellen und die Ausprägung des regelrechten Phänotyps unabdingbar zu sein.

Hinsichtlich der Karzinogenese ist von Interesse, ob sich die Expressionsmuster der HMGN-Proteine in verschieden differenzierten Malignomen eines Organes

unterscheiden bzw. ob je nach Stadium der Karzinogenese (z.B. Adenom – Karzinom des Kolons) unterschiedliche Expressionsmuster der HMGN-Proteine feststellbar sind. Diesbezügliche Untersuchungen wurden von Shakoori und Mitarbeitern an der Promyelozytenleukämie-Zelllinie HL-60 durchgeführt [130]. Es konnte gezeigt werden, dass in den proliferierenden Zellen HMGN1 und HMGN2 exprimiert werden und dass die Expression während der Phorbol-ester-induzierten Differenzierung vermindert wird. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Karzinomzelllinien des Gastrointestinaltraktes, in denen Butyrat die Differenzierung fördert, die Expression der HMGN-Proteine durch Butyratinkubation vermindert wird. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Frage, ob in diesen Zelllinien durch Überexpression der HMGN-Proteine die Butyrat-induzierte Differenzierung verhindert werden könnte bzw. im geringeren Ausmaß erfolgt (vergleiche in diesem Zusammenhang die Auswirkungen der HMGN1-Überexpression auf die Differenzierung von Myoblasten, siehe oben). Die Ergebnisse solcher Untersuchungen würden dann auch entscheidende Informationen über die Wirkmechanismen von Butyrat liefern, z.B. ob die Butyrat-induzierte Differenzierung – zumindest teilweise - über die Modulation der Expression der HMGN-Proteine vermittelt wird oder ob die verminderte Expression der HMGN-Proteine nur eine Folge der Butyrat-induzierten Differenzierung ist.

Wie auch die Kernhistone unterliegen die HMGN-Proteine posttranslationalen Modifikationen wie Acetylierung und Phosphorylierung [131] [88] [87]. Die HMGN-Proteine werden durch Histonacetylasen acetyliert [132], die Deacetylierung wird wahrscheinlich durch Histondeacetylasen katalysiert. Diese Modifikationen beeinflussen das Bindungsverhalten der HMGN-Proteine an die Nukleosomen und ihre Verteilung innerhalb des Zellkerns bzw. innerhalb der Zelle und damit auch deren Funktion.

Veränderungen der Chromatinstruktur durch ein unterschiedliches Ausmaß der Histonacetylierung scheinen bedeutsam in der Regulation der Transkription verschiedener Gene zu sein. So konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Transkriptionsaktivatoren und –koaktivatoren über eine Histonacetylaseaktivität verfügen (z.B. PCAF, CBP/300), während bei einigen Transkriptionsrepressoren eine Histondeacetylaseaktivität nachgewiesen wurde [63].

Neuere Untersuchungsergebnisse weisen auf die möglicherweise entscheidende Bedeutung von Veränderungen der Chromatinstruktur durch Histonhyperacetylierung bzw. Histonhypoacetylierung in der Karzinogenese humaner Malignome hin [63].

So konnte gezeigt werden, dass Estrogen in hormonabhängigen Mammakarzinomen eine verminderte Histonacetylierung bewirkt. Für das Retinablastom Tumor Suppressor Protein hingegen konnte eine Hemmung der Histondeacetylase 1 (HDAC 1) nachgewiesen werden [133].

Butyrat und Trichostatin A bewirken Wachstumsstopp und induzieren Differenzierung in einer Vielzahl von Karzinomzelllinien, beide sind Hemmstoffe der Histondeacetylasen und bewirken so eine Histonhyperacetylierung. Dies ist nicht nur ein *in vitro* -Effekt, sondern auch *in vivo* nachweisbar. Boffa und Mitarbeiter zeigten eine Korrelation zwischen erhöhten Butyratspiegeln und Histonhyperacetylierung in Kolonozyten bei Ratten, welche eine ballaststoffreiche Diät erhielten [134].

Hinnebusch und Mitarbeiter untersuchten die Fähigkeiten verschiedener kurzkettiger Fettsäuren (KKFS), eine Histonhyperacetylierung hervorzurufen [135]. Dabei zeigten sie, dass nicht alle der untersuchten KKFS eine Histonhyperacetylierung induzieren können. Interessanterweise haben solche KKFS, welche keinen Einfluss auf die Histonacetylierung haben, auch keinen nachweisbaren Effekt auf Zellwachstum und – differenzierung. Insgesamt zeigte sich, dass die antiproliferativen, apoptose- und differenzierungsfördernden Potenzen der untersuchten kurzkettigen Fettsäuren mit dem unterschiedlichen Ausmaß der Histonhyperacetylierung korrelieren. Durch Überexpression der Histondeacetylasen konnten die differenzierungsfördernden Wirkungen teilweise antagonisiert werden.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Hinnebusch liefern entscheidende Hinweise dafür, dass die Wirkungen von Butyrat auf maligne transformierte Zellen zumindest teilweise über eine Modulation der Chromatinstruktur, in diesem Falle über Hyperacetylierung von Histonproteinen, vermittelt werden.

Über die funktionellen Auswirkungen einer Hyperacetylierung von zusätzlichen Chromatinbestandteilen wie den HMGN1/2-Proteinen bzw. das Ausmaß deren Acetylierung in humanen Karzinomzellen ist derzeit wenig bekannt.

Lührs et al. konnten zeigen, dass Butyrat und Trichostatin A in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wahrscheinlich über eine Hemmung der Histondeacetylasen eine Hyperacetylierung von HMGN2 bewirken [136]. Wahrscheinlich werden durch diese Hyperacetylierung auch die Bindungseigenschaften

von HMGN2 an das Chromatin verändert. Ebenfalls führt Inkubation mit Butyrat bzw. TSA zu einer verminderten Expression von HMGN2-mRNA, wobei jedoch die Gesamtmenge von HMGN2-Protein im untersuchten Zeitraum unverändert bleibt. Dieser Sachverhalt ist bereits in der Literatur beschrieben und trat auch in nicht maligne transformierten Zellen auf. Pash und Mitarbeiter untersuchten die Expression von HMGN1 und HMGN2 in murinen Myoblasten [137]. Hier zeigte sich, dass HMGN1 und N2 während der Myogenese mit zunehmendem Differenzierungsgrad vermindert exprimiert werden, wobei sich die verminderte mRNA Expression nicht auf den Gesamtbestand von HMGN-Protein auswirkt. Im Falle der Butyrat-induzierten Hyperacetylierung ist denkbar, dass dadurch der Abbau des hyperacetylierten Proteins verlangsamt erfolgt. Längere Beobachtungszeiträume wären nötig, um hier weitere Erkenntnisse zu erlangen. Allerdings steigt bei längerer Butyratinkubation die Apoptoserate, was die Untersuchungen und die Interpretation der Ergebnisse erschwert [136].

Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu wissen, ob die unterschiedlichen kurzkettigen Fettsäuren auch die HMGN-Proteine im unterschiedlichen Ausmaße hyperacetylieren, so wie Hinnebusch und Mitarbeiter dies für die Histonhyperacetylierung zeigen konnten. Denkbar ist, dass die beschriebenen und bekannten Wirkungen der kurzkettigen Fettsäuren nicht nur auf der Hyperacetylierung der Histone, sondern auch teilweise auf einer Hyperacetylierung der HMGN-Proteine beruhen.

Möglicherweise ließen sich solche Erkenntnisse dann auch therapeutisch nutzen. Nachdem gezeigt wurde, dass Histonhyperacetylierung maligne Transformation behindert bzw. Histonhypoacetylierung Merkmal verschiedener Malignome ist, wurden die therapeutischen Konsequenzen dieser Erkenntnisse untersucht. Eine Reihe von Arbeitsgruppen beschäftigt sich mit dem möglichen Einsatz von Histondeacetylaseninhibitoren in der Behandlung von Malignomen. Dabei werden verschiedene Substanzen aus unterschiedlichen Stoffgruppen untersucht. Eine Übersicht findet sich bei Kouraklis [138]. Solche Substanzen sind beispielsweise Derivate von Trichostatin A. Teilweise werden gezielt solche neuen Chemotherapeutika synthetisiert, teilweise werden bei bereits vorhandenen Medikamenten solche Eigenschaften nachgewiesen. Interessanterweise konnte für Valproat, welches bisher in der Behandlung von Anfallsleiden und von affektiven Erkrankungen eingesetzt wurde, eine anti-tumoröse Wirkung (Suppression von Tumorwachstum und Metastasierung,

Induktion von Differenzierung) gezeigt werden. Valproat bewirkt u.a. eine Histonehyperacetylierung durch Hemmung der Histondeacetylasen [139].

Weitere Untersuchungen und Therapiestudien sind nötig, um den Einsatz solcher neuen Chemotherapeutika in der Behandlung humaner Malignome voranbringen zu können. Im Rahmen solcher Studien sollte dann auch der Einsatz von Butyrat – lokal oder systemisch- untersucht werden.

5. Zusammenfassung

In maligne transformierten Zellen fördert die kurzkettige Fettsäure Butyrat Differenzierung, induziert Apoptose und hemmt Proliferation. Dabei moduliert Butyrat die Expression von verschiedenen Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren. Wie Butyrat seine Wirkungen auf chromosomaler Ebene vermittelt, ist bisher nicht ausreichend geklärt. Bekannt ist, dass Butyrat Histondeacetylasen nichtkompetitiv hemmt und durch Hyperacetylierung von nukleären Histonproteinen die Chromatinstruktur moduliert.

Die „high-mobility-group“ (HMG) Proteine sind neben Histon-Proteinen strukturelle Bestandteile des Chromatins. Die vermehrte Expression des HMGA1-Proteins ist eine Gemeinsamkeit vieler humaner Malignome und die HMGA1-Proteinfamilie wurde selbst als neue Gruppe von Onkogenen erkannt. Die HMGA1 Proteine beeinflussen die Expression zahlreicher Gene und stehen selbst wiederum unter der Kontrolle von Onkogenen, wie z.B. dem c-myc.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Butyrat und der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A die Expression von HMGA1 in humanen Adenokarzinomzellen des Gastrointestinaltraktes modulieren. Butyrat-Konzentrationen von 2mM und 4mM führten erstmals nach 24-stündiger Inkubation zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1. In der Magenkarzinomzelllinie 23132/87 und der Kolonkarzinomzelllinie Sw-480 wird die HMGA1 mRNA Expression durch Butyrat zeit- und dosisabhängig reduziert. In der Kolonkarzinomzelllinie Sw-620 konnte für die untersuchten Konzentrationen keine Dosisabhängigkeit festgestellt werden. Auch Trichostatin A bewirkt eine Reduktion der mRNA-Expression von HMGA1 in den untersuchten Zelllinien.

Wie Butyrat die Expression von HMGA1 moduliert, ist nicht geklärt. Denkbar ist, dass Butyrat über Modulation vorgeschalteter Signalkaskaden, wie z.B. im Falle des c-myc, die HMGA1-Expression beeinflusst. Aber auch über eine Modulation der Chromatinstruktur durch Hemmung der Histondeacetylasen mit nachfolgenden Veränderungen der Expression verschiedener Gene könnte Butyrat die Expression von HMGA1 beeinflussen. Da die gleiche Wirkung auf die HMGA1-Expression durch den spezifischen Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A vermittelt wird, könnte die Hemmung dieser Enzyme der Mechanismus sein, über den Butyrat seine Wirkungen ausübt.

In vitro- und *in vivo*- Untersuchungen zeigen, dass eine Hemmung der HMGA1-Proteinsynthese die maligne Transformation verhindern, das metastatische Potential verringern und sogar das Wachstum bereits existenter Tumoren verlangsamen kann.

Der protektive Effekt von Butyrat hinsichtlich der malignen Transformation und die Wirkung von Butyrat auf bereits maligne transformierte Zellen könnten zumindest teilweise dadurch erklärt werden, dass Butyrat die Expression von HMGA1 in Tumorzellen reduziert und damit dessen malignes Potential vermindert.

Auch die Nicht-Histon-Proteine HMGN1 und HMGN2 stellen wichtige strukturelle Elemente des Chromatins dar. Sie werden sowohl in Normalgewebe als auch in maligne transformierten Zellen exprimiert. Auch die untersuchten Zelllinien Sw-480, Sw-620 und 23132/87 exprimieren HMGN1 und HMGN2. Signifikante Unterschiede zwischen der Primärtumorzelllinie Sw-480 und der Metastasenzelllinie Sw-620 des Sw-480 Kolonkarzinoms waren nicht feststellbar. Sowohl Butyrat als auch Trichostatin A senken in den untersuchten Karzinomzelllinien die Expression von HMGN1- bzw. HMGN2-mRNA, wobei dieser Effekt teilweise zeit- und dosisabhängig ist. Da die gleiche Wirkung auf die Expression von HMGN1 und HMGN2 durch den spezifischen Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A vermittelt wird, könnte die Hemmung der Histondeacetylasen auch in diesem Fall der Mechanismus sein, über den Butyrat seine Wirkungen ausübt.

Es gibt zunehmend Hinweise, dass HMGN1 und HMGN2 und die Modulation ihrer Expression eine bedeutende Rolle bei der Regulation zellulärer Vorgänge, wie z.B. Transkription und Replikation, haben. Nachdem in den letzten Jahren gezeigt wurde, welche Bedeutung Veränderungen der Chromatinstruktur durch Modifikation der Histonproteine für die Karzinogenese haben, ist zu vermuten, dass auch die Modulation der Chromatinbestandteile HMGN1 und HMGN2 in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnte. Über die Bedeutung der HMGN-Expression, deren Modulation bzw. die der posttranslationalen Modifikation in humanen Karzinomen ist bis jetzt wenig bekannt. Von Bedeutung könnte dabei z.B. die kürzlich nachgewiesene Butyrat-induzierte Hyperacetylierung von HMGN2 sein. Unklar ist noch das unterschiedliche Ausmaß der Acetylierung der HMGN-Proteine in verschiedenen differenzierten Karzinomen, der Vergleich zwischen Normalgewebe und maligne transformierten Zellen und die Dynamik der Acetylierung in der Tumorprogression. Denkbar ist, dass zumindest ein Teil der bekannten Wirkungen von Butyrat auf einer Modulation dieser Chromatinbestandteile mit nachfolgend veränderter Genexpression beruht.

6. Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, *Krebs in Deutschland*, 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002.
2. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
3. Thomas (Herausgeber), *Spezielle Pathologie*. Stuttgart, New York, Schattauer, 1996: Seite 227-250
4. Chung, D.C., *The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis*. gastroenterology, 2000. **119**: p. 854-65.
5. Scheppach, W., et al., *[Primary prevention of sporadic colorectal carcinoma by diet modification and drugs?]*. Internist (Berl), 2000. **41**(9): p. 868-75.
6. Willett, W.C., et al., *Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women*. N Engl J Med, 1990. **323**(24): p. 1664-72.
7. Giovannucci, E. and M.E. Martinez, *Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(23): p. 1717-30.
8. Kune, G.A., et al., *Smoking and colorectal cancer risk: data from the Melbourne Colorectal Cancer Study and brief review of literature*. Int J Cancer, 1992. **50**(3): p. 369-72.
9. Kune, G.A. and L. Vitetta, *Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991*. Nutr Cancer, 1992. **18**(2): p. 97-111.
10. Giovannucci, E., et al., *Physical activity, obesity, and risk of colorectal adenoma in women (United States)*. Cancer Causes Control, 1996. **7**(2): p. 253-63.
11. Scheppach, W., et al., *[Effect of nutrition factors on the pathogenesis of colorectal carcinoma]*. Zentralbl Chir, 2000. **125 Suppl 1**: p. 5-7.
12. Schmiegel, W., et al., *[Colorectal carcinoma: prevention and early detection in an asymptomatic population--prevention in patients at risk--endoscopic diagnosis, therapy and after-care of polyps and carcinomas. German Society of Digestive and Metabolic Diseases/Study Group for Gastrointestinal Oncology]*. Z Gastroenterol, 2000. **38**(1): p. 49-75.
13. Kronborg, O., et al., *Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test*. Lancet, 1996. **348**(9040): p. 1467-71.
14. Selby, J.V., et al., *A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer*. N Engl J Med, 1992. **326**(10): p. 653-7.
15. Mandel, J.S., et al., *Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study*. N Engl J Med, 1993. **328**(19): p. 1365-71.
16. Scheiman, J.M. and A.F. Cutler, *Helicobacter pylori and gastric cancer*. Am J Med, 1999. **106**(2): p. 222-6.
17. Thomson, C.A., et al., *Nutrition and diet in the development of gastrointestinal cancer*. Curr Oncol Rep, 2003. **5**(3): p. 192-202.
18. Braun, P., *Basislehrbuch Innere Medizin*. 1. Auflage, München, Urban und Fischer, 1999
19. Sipponen, P., *Gastric cancer: pathogenesis, risks, and prevention*. J Gastroenterol, 2002. **37 Suppl 13**: p. 39-44.
20. Fuchs, C.S., et al., *Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women [see comments]*. N Engl J Med, 1999. **340**(3): p. 169-76.

21. Pietinen, P., et al., *Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men*. Cancer Causes Control, 1999. **10**(5): p. 387-96.
22. Terry, P., et al., *Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(7): p. 525-33.
23. Kim, Y.I., *AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence*. Gastroenterology, 2000. **118**(6): p. 1235-57.
24. Bingham, S.A., et al., *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. Lancet, 2003. **361**(9368): p. 1496-501.
25. Cummings, J.H., et al., *Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood*. Gut, 1987. **28**: p. 1221-1227.
26. Butler, R.N., et al., *Pyruvate sparing by butyrate and propionate in proliferating colonic epithelium*. Comp Biochem Physiol B, 1990. **97**(2): p. 333-7.
27. Scheppach, W., H.P. Bartram, and F. Richter, *Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(7-8): p. 1077-80.
28. Bartram, H.P., et al., *Effects of calcium and deoxycholic acid on human colonic cell proliferation in vitro*. Ann Nutr Metab, 1997. **41**(5): p. 315-23.
29. Roediger, W.E., G. Rigol, and D. Rae, *Sodium absorption with bacterial fatty acids and bile salts in the proximal and distal colon as a guide to colonic resection*. Dis Colon Rectum, 1984. **27**(1): p. 1-5.
30. Topping, D.L. and R.J. Illman, *Bacterial fermentation in the human large bowel. Time to change from the roughage model of dietary fibre?* Med J Aust, 1986. **144**(6): p. 307-9.
31. Roediger, W.E., *Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man*. Gut, 1980. **21**(9): p. 793-8.
32. Wolever, T.M. and J.L. Chiasson, *Acarbose raises serum butyrate in human subjects with impaired glucose tolerance*. Br J Nutr, 2000. **84**(1): p. 57-61.
33. Scheppach, W., et al., *Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1992. **16**(1): p. 43-8.
34. Bartram, H.P., et al., *Antagonistic effects of deoxycholic acid and butyrate on epithelial cell proliferation in the proximal and distal human colon*. Z Gastroenterol, 1994. **32**(7): p. 389-92.
35. Hague, A., et al., *Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer*. Int J Cancer, 1993. **55**(3): p. 498-505.
36. Calabresse, C., et al., *Selective induction of apoptosis in myeloid leukemic cell lines by monoacetone glucose-3 butyrate*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **201**(1): p. 266-83.
37. Filippovich, I., et al., *Butyrate induced apoptosis in lymphoid cells preceded by transient over-expression of HSP70 mRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **198**(1): p. 257-65.
38. Kim, Y.S., et al., *Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells*. Cancer, 1980. **45**(5 Suppl): p. 1185-92.
39. Augeron, C. and C.L. Laboisse, *Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate*. Cancer Res, 1984. **44**(9): p. 3961-9.
40. Niles, R.M., et al., *The effect of sodium butyrate and retinoic acid on growth and CEA production in a series of human colorectal tumor cell lines*

- representing different states of differentiation. Cancer Invest, 1988. 6(1): p. 39-45.*
41. Saini, K., G. Steele, and P. Thomas, *Induction of carcinoembryonic-antigen-gene expression in human colorectal carcinoma by sodium butyrate. Biochem J, 1990. 272(2): p. 541-4.*
 42. Tanaka, Y., et al., *Enhancement of butyrate-induced differentiation of HT-29 human colon carcinoma cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Biochem Pharmacol, 1989. 38(21): p. 3859-65.*
 43. Whitehead, R.H., G.P. Young, and P.S. Bhathal, *Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). Gut, 1986. 27(12): p. 1457-63.*
 44. Obaya, A.J., et al., *The proto-oncogene c-myc acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27(Kip1) to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G(1) phase progression. J Biol Chem, 2002. 277(34): p. 31263-9.*
 45. Obaya, A.J. and J.M. Sedivy, *Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. Cell Mol Life Sci, 2002. 59(1): p. 126-42.*
 46. Siavoshian, S., et al., *Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 232(1): p. 169-72.*
 47. Archer, S.Y., et al., *p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(12): p. 6791-6.*
 48. Archer, S., et al., *Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. Surgery, 1998. 124(2): p. 248-53.*
 49. Schwartz, B., C. Avivi-Green, and S. Polak-Charcon, *Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. Mol Cell Biochem, 1998. 188(1-2): p. 21-30.*
 50. Moss, S., et al., *Increased intestinal Bak expression results in apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 223: p. 199-203.*
 51. Medina, V., et al., *Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. Cancer Res, 1997. 57(17): p. 3697-707.*
 52. Ruetteme, F.M., et al., *Butyrate mediates caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro- apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP- ribose) polymerase (PARP) [In Process Citation]. Cell Death Differ, 1999. 6(8): p. 729-35.*
 53. Bonnotte, B., et al., *Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. Cell Death Differ, 1998. 5(6): p. 480-7.*
 54. Giardina, C., H. Boulares, and M.S. Inan, *NSAIDs and butyrate sensitize a human colorectal cancer cell line to TNF-alpha and Fas ligation: the role of reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta, 1999. 1448(3): p. 425-38.*
 55. Emenaker, N.J., et al., *Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. J Nutr, 2001. 131(11 Suppl): p. 3041S-6S.*
 56. Gibson, P.R., et al., *Butyrate is a potent inhibitor of urokinase secretion by normal colonic epithelium in vitro. Gastroenterology, 1994. 107(2): p. 410-9.*
 57. Perrin, P., et al., *An interleukin 2/sodium butyrate combination as immunotherapy for rat colon cancer peritoneal carcinomatosis. Gastroenterology, 1994. 107(6): p. 1697-708.*

58. Tsai, L.C., et al., *Apoptosis induced by the sodium butyrate in human gastric cancer TMK-1 cells*. Anticancer Res, 2000. **20**(4): p. 2441-8.
59. Litvak, D.A., et al., *Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate*. Anticancer Res, 2000. **20**(2A): p. 779-84.
60. Sealy, L. and R. Chalkley, *The effect of sodium butyrate on histone modification*. Cell, 1978. **14**: p. 115-21.
61. Sterner, R., G. Vidali, and V.G. Allfrey, *Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins. Identification of the sites of acetylation in high mobility group proteins 14 and 17*. J Biol Chem, 1981. **256**(17): p. 8892-5.
62. Kouzarides, T., *Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(1): p. 40-8.
63. Archer, S.Y. and R.A. Hodin, *Histone acetylation and cancer*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(2): p. 171-4.
64. Yoshida, M., et al., *Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A*. J Biol Chem, 1990. **265**(28): p. 17174-9.
65. Della Razione, F., et al., *Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity*. FEBS Lett, 2001. **499**(3): p. 199-204.
66. Mariadason, J.M., G.A. Corner, and L.H. Augenlicht, *Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4561-72.
67. Bustin, M., D.A. Lehn, and D. Landsman, *Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1049**(3): p. 231-43.
68. Bustin, M., *Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(3): p. 152-3.
69. Bustin, M., *Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(8): p. 5237-5246.
70. Grunstein, M., *Nucleosomes: regulators of transcription*. Trends Genet, 1990. **6**(12): p. 395-400.
71. Kuo, M.H. and C.D. Allis, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays, 1998. **20**(8): p. 615-26.
72. Brown, C.E., et al., *The many HATs of transcription coactivators*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(1): p. 15-9.
73. Cheung, W.L., S.D. Briggs, and C.D. Allis, *Acetylation and chromosomal functions*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(3): p. 326-33.
74. Cheung, P., C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi, *Signaling to chromatin through histone modifications*. Cell, 2000. **103**(2): p. 263-71.
75. Grunstein, M., *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature, 1997. **389**(6649): p. 349-52.
76. Pash, J., et al., *Chromosomal protein HMG-14 gene maps to the Down syndrome region of human chromosome 21 and is overexpressed in mouse trisomy 16*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(10): p. 3836-40.
77. Shirakawa, H., et al., *Targeting of high mobility group-14/-17 proteins in chromatin is independent of DNA sequence*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37937-44.
78. Hock, R., U. Scheer, and M. Bustin, *Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 are released from mitotic chromosomes and imported into the nucleus by active transport*. J Cell Biol, 1998. **143**(6): p. 1427-36.

79. Trieschmann, L., et al., *Modular structure of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17: definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(12): p. 6663-9.
80. Crippa, M.P., P.J. Alfonso, and M. Bustin, *Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain*. J Mol Biol, 1992. **228**(2): p. 442-9.
81. Ding, H.F., M. Bustin, and U. Hansen, *Alleviation of histone H1-mediated transcriptional repression and chromatin compaction by the acidic activation region in chromosomal protein HMG-14*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(10): p. 5843-55.
82. Bustin, M. and R. Reeves, *High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1996. **54**: p. 35-100.
83. Catez, F., et al., *Competition between histone H1 and HMGN proteins for chromatin binding sites*. EMBO Rep, 2002. **3**(8): p. 760-6.
84. Phair, R.D. and T. Misteli, *High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 604-9.
85. Thomson, S., et al., *The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase*. Embo J, 1999. **18**(17): p. 4779-93.
86. Barratt, M.J., et al., *A mitogen- and anisomycin-stimulated kinase phosphorylates HMG-14 in its basic amino-terminal domain in vivo and on isolated mononucleosomes*. Embo J, 1994. **13**(19): p. 4524-35.
87. Bergel, M., et al., *Acetylation of novel sites in the nucleosomal binding domain of chromosomal protein HMG-14 by p300 alters its interaction with nucleosomes*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 11514-20.
88. Herrera, J.E., et al., *Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3466-73.
89. Reeves, R., *Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function*. Gene, 2001. **277**(1-2): p. 63-81.
90. Foti, D., et al., *A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2720-32.
91. Reeves, R. and L. Beckerbauer, *HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1519**(1-2): p. 13-29.
92. Banks, G.C., Y. Li, and R. Reeves, *Differential in vivo modifications of the HMGI(Y) nonhistone chromatin proteins modulate nucleosome and DNA interactions*. Biochemistry, 2000. **39**(28): p. 8333-46.
93. Chiappetta, G., et al., *High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development*. Oncogene, 1996. **13**(11): p. 2439-46.
94. Giancotti, V., et al., *High-mobility-group (HMG) proteins and histone H1 subtypes expression in normal and tumor tissues of mouse*. Eur J Biochem, 1993. **213**(2): p. 825-32.
95. Bussemakers, M.J., et al., *Identification of high mobility group protein I(Y) as potential progression marker for prostate cancer by differential hybridization analysis*. Cancer Res, 1991. **51**(2): p. 606-11.
96. Kim, S.J., J.W. Ryu, and D.S. Choi, *The expression of the high mobility group I(Y) mRNA in thyroid cancers: useful tool of differential diagnosis of thyroid nodules*. Korean J Intern Med, 2000. **15**(1): p. 71-5.

97. Abe, N., et al., *Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) proteins*. *Cancer Res*, 2000. **60**(12): p. 3117-22.
98. Abe, N., et al., *Diagnostic significance of high mobility group I(Y) protein expression in intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas*. *Pancreas*, 2002. **25**(2): p. 198-204.
99. Bandiera, A., et al., *Expression of HMGI(Y) proteins in squamous intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix*. *Cancer Res*, 1998. **58**(3): p. 426-31.
100. Giannini, G., et al., *Expression of the HMGI(Y) gene products in human neuroblastic tumours correlates with differentiation status*. *Br J Cancer*, 2000. **83**(11): p. 1503-9.
101. Nam, E.S., et al., *Expression of HMGI(Y) associated with malignant phenotype of human gastric tissue*. *Histopathology*, 2003. **42**(5): p. 466-71.
102. Rajeswari, M.R., et al., *Elevated levels of high-mobility-group chromosomal proteins, HMGAI, in murine skin carcinoma*. *Cancer Lett*, 2001. **173**(1): p. 93-9.
103. Tallini, G. and P. Dal Cin, *HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors*. *Adv Anat Pathol*, 1999. **6**(5): p. 237-46.
104. Tallini, G., et al., *Expression of HMGI-C and HMGI(Y) in ordinary lipoma and atypical lipomatous tumors: immunohistochemical reactivity correlates with karyotypic alterations*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(1): p. 37-43.
105. Wood, L.J., et al., *The oncogenic properties of the HMG-I gene family*. *Cancer Res*, 2000. **60**(15): p. 4256-61.
106. Takaha, N., et al., *High mobility group protein I(Y): a candidate architectural protein for chromosomal rearrangements in prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(3): p. 647-51.
107. Leibovitz, A., et al., *Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines*. *Cancer Res*, 1976. **36**(12): p. 4562-9.
108. Vollmers, H.P., et al., *Characterization of four new gastric cancer cell lines*. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1993. **63**(6): p. 335-43.
109. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of histones and transcription-related factors*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000. **64**(2): p. 435-59.
110. Fedele, M., et al., *Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins*. *Cancer Research*, 1996. **56**: p. 1896-1901.
111. Chiappetta, G., et al., *High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases*. *Int J Cancer*, 2001. **91**(2): p. 147-51.
112. Toscani, A., D.R. Soprano, and K.J. Soprano, *Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest*. *Oncogene Res*, 1988. **3**(3): p. 223-38.
113. Barnard, J.A. and G. Warwick, *Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells*. *Cell Growth Differ*, 1993. **4**(6): p. 495-501.
114. Basson, M.D., N.J. Emenaker, and F. Hong, *Differential modulation of human (Caco-2) colon cancer cell line phenotype by short chain fatty acids*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998. **217**(4): p. 476-83.
115. Diana, F., et al., *A link between apoptosis and degree of phosphorylation of high mobility group A1a protein in leukemic cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(14): p. 11354-61.
116. Reeves, R., D.D. Edberg, and Y. Li, *Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(2): p. 575-94.
117. Dolde, C.E., et al., *HMG-I/Y in human breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res Treat*, 2002. **71**(3): p. 181-91.

118. Berlingieri, M.T., et al., *Thyroid cell transformation requires the expression of the HMGAI proteins*. *Oncogene*, 2002. **21**(19): p. 2971-80.
119. Liu, F., et al., *The HMG I proteins: dynamic roles in gene activation, development, and tumorigenesis*. *Immunol Res*, 2001. **24**(1): p. 13-29.
120. Scala, S., et al., *Adenovirus-mediated suppression of HMG I(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4256-61.
121. Yan, J. and Y.H. Xu, *Tributyryn inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest*. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(4): p. 660-4.
122. Beckerbauer, L., et al., *FR900482 class of anti-tumor drugs cross-links oncoprotein HMG I/Y to DNA in vivo*. *Chem Biol*, 2000. **7**(10): p. 805-12.
123. Carvajal, I.M., R.M. Baron, and M.A. Perrella, *High-mobility group-I/Y proteins: Potential role in the pathophysiology of critical illnesses*. *Crit Care Med*, 2002. **30**(1 Supp): p. S36-S42.
124. Li, L., et al., *Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins*. *J Virol*, 2000. **74**(23): p. 10965-74.
125. Kondos, H., et al., *Elevated levels of the chromosomal protein HMG 17 in chronic myelogenous leukemia*. *Biochem Mol Biol Int*, 1995. **36**(4): p. 803-9.
126. Lehtonen, S., et al., *HMG-17, a chromosomal non-histone protein, shows developmental regulation during organogenesis*. *Int J Dev Biol*, 1998. **42**(6): p. 775-82.
127. Lehtonen, S. and E. Lehtonen, *HMG-17 is an early marker of inductive interactions in the developing mouse kidney*. *Differentiation*, 2001. **67**(4-5): p. 154-63.
128. Bustin, M., et al., *Characterization of transgenic mice with an increased content of chromosomal protein HMG-14 in their chromatin*. *DNA Cell Biol*, 1995. **14**(12): p. 997-1005.
129. Pash, J.M., P.J. Alfonso, and M. Bustin, *Aberrant expression of high mobility group chromosomal protein 14 affects cellular differentiation*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(18): p. 13632-8.
130. Shakoori, A.R., et al., *Differential expression of the chromosomal high mobility group proteins 14 and 17 during the onset of differentiation in mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells*. *J Cell Biochem*, 1993. **51**(4): p. 479-87.
131. Prymakowska-Bosak, M., et al., *Mitotic phosphorylation prevents the binding of HMGN proteins to chromatin*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(15): p. 5169-78.
132. Wong, L.C., D.J. Sharpe, and S.S. Wong, *High-mobility group and other nonhistone substrates for nuclear histone N-acetyltransferase*. *Biochem Genet*, 1991. **29**(9-10): p. 461-75.
133. Brehm, A., et al., *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. *Nature*, 1998. **391**(6667): p. 597-601.
134. Boffa, L.C., et al., *Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats*. *Cancer Res*, 1992. **52**(21): p. 5906-12.
135. Hinnebusch, B.F., et al., *The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation*. *J Nutr*, 2002. **132**(5): p. 1012-7.
136. Lührs, H., et al., *Hyperacetylation of non-histone protein HMG-17 in butyrate treated human colon adenocarcinoma cells*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(4): p. A292.

137. Pash, J.M., et al., *Persistence of chromosomal proteins HMG-14/-17 in myotubes following differentiation-dependent reduction of HMG mRNA*. J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4197-9.
138. Kouraklis, G. and S. Theocharis, *Histone deacetylase inhibitors and anticancer therapy*. Curr Med Chem Anti-Canc Agents, 2002. **2**(4): p. 477-84.
139. Blaheta, R.A. and J. Cinatl, Jr., *Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug*. Med Res Rev, 2002. **22**(5): p. 492-511.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. W. Scheppach für die Überlassung des Themas.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med H. Lührs für die Betreuung während den experimentellen Arbeiten, für die fruchtbaren Diskussionen und für die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit. Danken möchte ich ebenso Herrn Dr. rer.nat. R. Hock am Biozentrum der Universität für die Einarbeitung in die wissenschaftliche Methoden, die Überlassung der spezifischen Sonden und die wertvollen Anregungen.

Danken möchte ich ebenfalls Frau B. Schieber für die Durchsicht des Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn F. Kreth für seine freundschaftliche Unterstützung und Hilfestellung und Frau E. Kelber sowie allen anderen Mitarbeitern des Gastroenterologischen Labors für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die technische Unterstützung.

Nicht zuletzt gehört mein Dank meinen Eltern und meinem Bruder, die mich jederzeit unterstützten und ebenso kritische wie wertvolle Hinweise und Anregungen gaben.

Marc- Andreas Günter Weihrauch

In der Hohl 7
56073 Koblenz
Tel. (privat): 0261/ 5799777
Tel. (dienstlich): 0261/ 281-2621

Lebenslauf:

Persönliche Informationen:

Marc-Andreas Günter Weihrauch,
geboren am 10.05.1976 in Landau/Pfalz
wohnhaft in 56073 Koblenz, In der Hohl 7
ledig, keine Kinder

Eltern:

Ina Weihrauch, geborene Munkelt, geboren am
17.04.1944 in Gallingen/ Ostpreußen

Dr. Günter Weihrauch, geboren am 18.05.1930 in
Annaberg/ Sachsen

Bildungsweg:

Schulische Ausbildung:

1982-1985 Grundschule in Neustadt/ Weinstraße,
Ortsteil Gimmeldingen
1985-1986 Grundschule in Schönberg-Ottensoos
1986-1995 Gymnasium Röthenbach/ Pegnitz
1995 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

Wintersemester 1995/1996 Studium der Human-
medizin an der Universität Erlangen-Nürnberg

Wintersemester 1996/97 bis Sommersemester
1998 Studium der Humanmedizin an der
Universität Regensburg
Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung am
02.10.1998 in Regensburg

Wintersemester 1998/1999 bis Wintersemester
2002/2003 Studium der Humanmedizin an der
Universität Würzburg

Ablegen des Ersten Abschnittes der Ärztlichen
Prüfung am 21.9.1999 in Würzburg

Ablegen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung am 13.9.2001 in Würzburg

Praktische Ausbildung vom:

22.10.2001 bis zum 10.02.2002 an der
Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

11.02.2002 bis zum 02.06.2002 an der
Neurologischen Universitätsklinik Würzburg

03.06.2002 bis zum 22.09.2002 in der
Chirurgischen Klinik, Juliusspital Würzburg

Ablegen des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung und Abschluss des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians Universität Würzburg am 28.11. 2002.

Beruflicher Werdegang:

01.01.1996 Eintritt in die Bundeswehr und
Übernahme in die Laufbahn der
Sanitätsoffizieranwärter.

Seit 13.12.2002 Tätigkeit als Arzt im Praktikum
in der Abteilung Neurologie und Psychiatrie des
Bundeswehrzentralkrankenhauses Koblenz.

Koblenz, den 09.01.2004

Marc Weihrauch