

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

**Modulation von Zellzyklus- und Apoptoseregulation in
humanen kolorektalen Karzinomzellen durch
Butyrat und Acetylsalicylsäure**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von

Jürgen Schauber
aus Ehingen (Donau)

Würzburg, Februar 2001

Referent: Prof. Dr. med. W. Scheppach

Korreferent: Prof. Dr. med. W. Timmermann

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2001

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	<i>Das kolorektale Karzinom</i>	1
1.2	<i>Ernährungsfaktoren und Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms</i>	2
1.3	<i>Apoptose- und Zellzyklusregulation</i>	7
1.4	<i>Ziele der vorliegenden Untersuchungen</i>	15
2	Material und Methoden	
2.1	<i>Zellkultur</i>	
2.1.1.	Zelllinien und Kulturmedien	16
2.1.2.	Zellkulturexperimente.....	16
2.2	<i>Zelldifferenzierungsversuche</i>	18
2.3	<i>Zellstimulationsversuche</i>	19
2.4	<i>Western-Blot</i>	
2.4.1.	SDS-PAGE, Blotten und Färbung.....	19
2.4.2.	Antikörper.....	22
2.5	<i>Statistische Analyse</i>	22
3	Ergebnisse	
3.1	<i>Einfluss von Butyrat und Acetylsalicylsäure auf die Proliferation und Apoptoseinduktion</i>	
3.1.1.	Zellproliferation und Apoptoseinduktion.....	24
3.1.2.	PCNA	33

3.2	<i>Einfluss von Butyrat und Acetylsalicylsäure auf die Zelldifferenzierung von Kolonkarzinomzellen</i>	
3.2.1.	Carcinoembryonales Antigen	34
3.3	<i>Modulation von Faktoren der Apoptosekontrolle durch Butyrat und Acetylsalicylsäure</i>	
3.3.1.	Bcl-X _L	36
3.3.2.	Bak	37
3.3.3.	p53	38
3.3.4.	14-3-3 ϵ	39
3.3.5.	Mcl-1	40
3.4	<i>Modulation von Faktoren der Zellzykluskontrolle durch Butyrat und Acetylsalicylsäure</i>	
3.4.1.	cdk2	42
3.4.2.	Cyclin D ₃	44
3.4.3.	p21 ^{Waf1/Cip1}	45
3.4.4.	p16	47
3.5	<i>Effekt von Butyrat auf die NFκB Signaltransduktionskaskade</i>	49
4	Diskussion	51
5	Zusammenfassung	71
6	Verwendete Abkürzungen	73
7	Literaturverzeichnis	74
8	Danksagung	
9	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Bei den malignen Kolontumoren handelt es sich in 90-95% um Adenokarzinome, die sich aus gutartigen Adenomen entwickeln. Wenigstens 50% der Bevölkerung in den Industriestaaten erkrankt bis zu einem Alter von 70 Jahren an einem kolorektalen Adenom. In ungefähr einem Zehntel dieser Individuen entwickelt sich die zunächst benigne Neoplasie weiter zu einem invasiven Karzinom (Kinzler und Vogelstein 1996). Inzwischen ist eine Abfolge von genetischen Mutationen definiert worden, die mit der Kolonkarzinom-entwicklung assoziiert ist (Kinzler und Vogelstein 1996).

In 5-10 % wird das Kolonkarzinom autosomal-dominant vererbt (Mayer 1998). Unter den familiären Kolonkarzinomen unterscheidet man Karzinome infolge der familiären Polyposis coli (Mutation im APC-Gen) und das Lynch-Syndrom mit Mutationen in DNA-mismatch-repair Genen. Mit einer Inzidenz von etwa 25 pro 100.000 Einwohnern und Jahr ist das Kolonkarzinom der häufigste maligne Tumor des Gastrointestinaltraktes. Das kolorektale Karzinom ist unter Frauen und Männern gleichermaßen das zweithäufigste Karzinom (Kinzler und Vogelstein 1996; Ihde und Longo 1998). Für Männer liegt das Risiko, zeitlebens an einem kolorektalen Malignom zu erkranken, bei 6,14%, für Frauen bei 5,92% (Sandler 1996). Während das kolorektale Karzinom bis zu einem Alter von 50 Jahren selten ist, steigt seine Inzidenz danach mit steigendem Alter steil an und erreicht seinen Manifestationsgipfel im 6. und 7. Lebensjahrzehnt (Sandler 1996). Rund 60% der Tumoren im Kolon finden sich im Rektosigmoid.

Klinische Symptome treten meist spät in Erscheinung, da die Tumoren in der Regel langsam wachsen und für Jahre klinisch stumm bleiben können. Die ersten Symptome erkrankter Patienten umfassen meist Veränderungen im Allgemeinbefinden, wie Müdigkeit, Schwäche und Gewichtsverlust. Bei distalem Sitz können Veränderungen der Stuhlbeschaffenheit und Wechsel von Obstipation und Durchfall beobachtet werden. Im asymptomatischen Stadium kann der Nachweis von okkultem Blut im Stuhl ein früher Hinweis auf ein Kolonkarzinom sein (Mayer 1998).

Bei klinisch begründetem Verdacht ist die totale Koloskopie das diagnostische Mittel der Wahl. Sie erlaubt den direkten Nachweis des Tumors und ermöglicht eine bioptische Abklärung. Die radikale Tumoresektion ist das Ziel jeder Behandlung. Die mittlere 5-Jahres-Überlebenszeit des Kolonkarzinoms aller Stadien liegt bei etwa 50%.

1.2 Ernährungsfaktoren und Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms

Ballaststoffe und Butyrat

Das kolorektale Epithel steht in direktem Kontakt mit dem Inhalt des Dickdarms. Als Folge davon können Ernährungsfaktoren einen Effekt auf das Wachstums- und Differenzierungsmuster, sowie auf das Überleben der Kolonepithelzellen ausüben. Tatsächlich wird in epidemiologischen Studien der Ernährung eine wichtige Rolle in der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms zugeschrieben. Sie wird insbesondere als wichtiger Faktor für die hohe Inzidenz kolorektaler Malignome in westlichen Ländern ausgewiesen (Sandler 1996). Als Erklärung für diese Beobachtung wird in den erwähnten Studien eine fettreiche und ballaststoffarme Ernährungsform in den Industrieländern vorgeschlagen (Howe, Benito et al. 1992). Ballaststoffe sind unverdaubare Kohlenhydrate, welche Eigenschaften aufweisen, die im Sinne der Protektion vor kolorektalen Karzinomen interpretiert werden können. Sie beschleunigen die intestinale Transitrate, vergrößern das Stuhlvolumen (verringern damit die Exposition der Schleimhaut mit Karzinogenen in der Ernährung) und absorbieren Karzinogene. Weiterhin modifizieren sie die intestinale Mikroflora (und hierdurch möglicherweise den Gallensäurenmetabolismus und das Verhalten von Karzinogenen), verändern die Gallensäureausscheidung, verringern den luminalen pH-Wert und erhöhen die Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren im Kolon und Rektum (zusammengestellt in McIntyre, Gibson et al. 1993). Kohlenhydrate und andere Ernährungsbestandteile, die dem Verdauungsprozess und Absorption im Dünndarm entgehen, werden im Dickdarm durch anaerobe Bakterien fermentiert. Dabei entstehen als

Nebenprodukte kurzkettige Fettsäuren, wie Acetat, Propionat und Butyrat, in einer Menge von mindestens 300mMol pro Tag (Cummings 1981). Die kurzkettigen Fettsäuren stellen die quantitativ wichtigsten organischen Anionen im Kolonlumen dar und liegen in einem molaren Verhältnis von 57:22:21 (Acetat: Propionat: Butyrat) vor (Cummings, Pomare et al. 1987). Butyrat wird von den kolorektalen Epithelzellen aufgenommen und zur Gewinnung von Energie für den Zellstoffwechsel metabolisiert (Roediger 1982). Es deckt 70% des gesamten Energiebedarfs der Zelle und wird bevorzugt vor anderen Energieträgern, wie Glutamin und Glucose, verstoffwechselt (Roediger 1982; Scheppach 1994). Eine unzureichende Versorgung der Schleimhaut mit Butyrat, oder ein Stoffwechseldefekt im Butyratmetabolismus, führen zu einer Atrophie der Kolonmukosa und nachfolgender Entzündung des Epithels (Roediger 1980; Roediger 1990). Sowohl im Tierexperiment als auch bei Inkubation von humanem Kolonbiopsiematerial steigert Butyrat das Wachstum von Kolonepithelzellen und dient normalen Kolonozyten als Überlebensfaktor (Bartram, Scheppach et al. 1993; Hass, Busche et al. 1997).

Im Unterschied dazu stehen Untersuchungen an humanen Kolonadenom- und Karzinomzelllinien: *In vitro* Studien haben gezeigt, dass Butyrat in physiologischer Konzentration die Zellproliferation von Adenom- und Kolonkarzinomzellen hemmt und gleichzeitig die Differenzierung der Zellen fördert (Gamet, Daviaud et al. 1992; Hague und Paraskeva 1995; Basson, Turowski et al. 1996). Butyrat beeinflusst die Expression von Zelladhäsionsmolekülen an der Oberfläche von Karzinomzellen und vermindert deren Vermögen zu invasivem Wachstum (Basson, Turowski et al. 1996). Zusätzlich führt Butyrat bei humanen kolorektalen Karzinomzellen und in Adenomzelllinien zur Induktion von Apoptose (Hague, Elder et al. 1995; Ruemmele, Dionne et al. 1999). Die apoptotische Zellfraktion zeigt dabei einen höheren Differenzierungsgrad als die proliferierende Zellfraktion. Dies lässt vermuten, dass die Karzinomzellen unter Butyratbehandlung zunächst differenzieren und daran anschließend der Apoptose unterliegen (Heerdt, Houston et al. 1994). Wird, nach chemisch induzierter Karzinogenese, an Ratten eine Diät verfüttert, die reich an fermentierbaren Kohlenhydraten ist,

zeigt sich ein deutlicher Anstieg der fäkalen Butyratspiegel. Die erfasste Tumormasse und die Höhe der gemessenen Butyratspiegel korrelieren negativ miteinander (McIntyre, Gibson et al. 1993). Gleichzeitig kommt es in diesem Tiermodell zu einer signifikanten Abnahme der Zahl von Vorläuferstufen der Karzinogenese (aberrant crypt foci; (Takayama, Katsuki et al. 1998)) durch Induktion von Apoptose und Hemmung der Proliferation an der Kryptenspitze (Compher, Frankel et al. 1999). Die Applikation von Butyrat verringert das Risiko der Entwicklung eines Kolonmalignoms auf dem Boden einer chronischen Kolitis bei Ratten (D'Argenio, Cosenza et al. 1996). Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom oder Adenomen werden niedrigere fäkale Butyratspiegel gefunden, als bei gesunden Patienten in einer Kontrollgruppe (Weaver, Krause et al. 1988).

Zusammenfassend zeigt Butyrat zwei verschiedene Wirkungen auf Kolonepithelzellen: Es dient als primäre Energiequelle und stimuliert das Wachstum der normalen Kolonschleimhaut. Bei Kolonkarzinomzelllinien und im Tiermodell hemmt Butyrat die Zellproliferation, steigert den Differenzierungsgrad der Zellen, induziert Apoptose und hemmt die Karzinogenese (Csordas 1996).

Die genauen intrazellulären Mechanismen der Butyratwirkung auf die Kolonepithelzelle sind noch weitgehend unklar. Butyrat induziert durch Inhibition der Histondeacetylase eine Hyperacetylierung der Histone H3 und H4, welche an der räumlichen Organisation des Zellchromatins beteiligt sind (Archer, Meng et al. 1998). Diese Wirkung des Butyrats ähnelt der des spezifischen Histondeacetylase-Hemmers Trichostatin. Die durch Trichostatin induzierten Veränderungen in der Chromatinstruktur können zu einer veränderten Genexpression führen (Medina, Edmonds et al. 1997). Zudem hat Butyrat Einfluss auf verschiedene Transkriptionsfaktoren in der Zelle (Souleimani und Asselin 1993; Thompson, Rosenthal et al. 1998).

Acetylsalicylsäure und Chemoprävention

Epidemiologische Studien zeigen, dass Acetylsalicylsäure einen protektiven Effekt auf die Adenombildung im Dickdarm (Greenberg, Baron et al. 1993)

sowie die kolorektale Karzinogenese (Giovannucci, Rimm et al. 1994; Heath, Thun et al. 1994; Giovannucci, Egan et al. 1995) hat. Das Ausmaß der schützenden Wirkung, welche das Kolonkarzinomrisiko bei regelmäßiger Einnahme von Acetylsalicylsäure auf bis zu 50% reduzieren kann, ist abhängig von der Dosis und der Einnahmedauer. Ein positiver Effekt auf die kolorektale Karzinogenese kann erst nach langjähriger Einnahme von Acetylsalicylsäure beobachtet werden (Muir und Logan 1999). Die geeignete Acetylsalicylsäure-Dosierung ist noch nicht definiert, erste Studien legen eine tägliche Einnahme zwischen mindestens 80 bis 325mg Acetylsalicylsäure nahe (Aoki, Boland et al. 1996; Muir und Logan 1999). Der karzinoprotektiven Wirkung gegenüber stehen die durch Acetylsalicylsäure ausgelösten Nebenwirkungen, wie gastroduodenale Ulkusbildungen, intestinale Blutungen und Typ-C Gastritiden. Zukünftige Präventionsstrategien sollten daher darauf zielen, die einzunehmende Acetylsalicylsäuremenge möglichst niedrig zu halten (Jackson und Hawkey 1999).

Acetylsalicylsäure vermindert die intestinale Tumorbildung im Min-Mausmodell, einem Tiermodell mit spontanen intestinalen Neoplasien aufgrund eines Gendefektes im APC-Gen (Barnes und Lee 1998). In einem anderen Tiermodell mit chemisch induzierter Karzinogenese verhindert Acetylsalicylsäure die Bildung von Neoplasien (Craven und DeRubertis 1992; Reddy, Rao et al. 1993). Im Zellkulturexperiment hemmt Acetylsalicylsäure das Zellwachstum und induziert Apoptose bei humanen kolorektalen Karzinomzellen (Shiff, Koutsos et al. 1996; Shiff und Rigas 1997; Qiao, Hanif et al. 1998). Die Reduktion des Kolonkarzinomrisikos scheint ein gemeinsames Merkmal der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) zu sein, da auch andere Vertreter dieser Gruppe wie Sulindac (Pasricha, Bedi et al. 1995; Giardiello, Spannhake et al. 1998) und Piroxicam (Jacoby, Marshall et al. 1996) die intestinale Tumorbildung beeinflussen.

Als potentieller Mechanismus der Acetylsalicylsäurewirkung wird eine Senkung der Prostaglandinspiegel durch Inhibition von Cyclooxygenasen (Cox-1, Cox-2), Enzymen, welche die Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure katalysieren, angenommen (Giardiello, Spannhake et al. 1998). Das Enzym

Cyclooxygenase-1 (Cox-1) wird in den meisten Körpergeweben kontinuierlich exprimiert. Cox-2 hingegen wird nur unter bestimmten Bedingungen, wie etwa bei Stimulation von Geweben durch Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Entzündungsmediatoren von den Körperzellen exprimiert (Smith, Garavito et al. 1996). Der Gehalt an Cox-2 Enzym in Adenokarzinomen im Dickdarm ist im Vergleich zu normaler Kolonschleimhaut deutlich erhöht. Dies legt den Verdacht nahe, das Enzym könnte in der kolorektalen Karzinogenese eine Rolle spielen (Dimberg, Samuelsson et al. 1999). Weiterhin verstärkt die stabile Transfektion von Kolonepithelzellen mit dem Cox-2 Gen das maligne Potential der Zellen (Tsujii und DuBois 1995). Die Prostaglandingewebsspiegel sind in kolorektalen Adenomen und Karzinomen erhöht und könnten Tumorbildung und – wachstum beeinflussen (Marnett 1992; Pugh und Thomas 1994). Die Senkung der Prostaglandinspiegel in der Schleimhaut von Patienten mit familiärer Polyposis coli durch NSAIDs geht mit einer Regression der rektalen Polypen einher (Giardiello, Spannhake et al. 1998). Oshima et al. konnten zeigen, dass eine Blockierung von Cox-2 die Tumorbildung im APC^{min}-Mausmodell deutlich verlangsamt (Oshima, Dinchuck et al. 1996). Allerdings zeigen nicht alle Studien zur kolorektalen Karzinogenese unter Behandlung mit nichtsteroidalen Antiphlogistika einen Zusammenhang mit dem Prostaglandinstoffwechsel (Piazza, Rahm et al. 1997). Cyclooxygenase-Inhibitoren lösen den programmierten Zelltod auch in Zellen aus, welche kein Cox-Enzym exprimieren (Zhang, Morham et al. 1999) oder ohne deren Expression zu modulieren (Elder, Halton et al. 1997). Denselben Effekt hat Sulindac-Sulfon, ein Derivat des Antiphlogistikums Sulindac, welches die Proliferation von Kolonkrebszellen verlangsamt und Apoptose auslöst, ohne aber eine inhibierende Wirkung auf die Cyclooxygenase-Enzyme zu haben (Rigas und Shiff 1999). Der Acetylsalicylsäuremetabolit Salicylsäure, welcher durch Deacetylierung entsteht, entfaltet die gleiche Wirkung auf Adenom- und Kolonkarzinomzellen, obwohl die Wirkung auf den Prostaglandinstoffwechsel minimal ist (Elder, Hague et al. 1996; Rigas und Shiff 1999). Die gleichzeitige Zugabe der Produkte der Cyclooxygenasen mit den NSAIDs in die Zellkultur verhindert nicht deren pro-apoptotische Wirkung (Jackson und Hawkey 1999).

Acetylsalicylsäure übt seine Wirkungen und Nebenwirkungen in vivo hauptsächlich über eine Blockierung von Cox-1 aus und weniger über das in diesem Zusammenhang diskutierte Cox-2-Enzym (Jackson und Hawkey 1999). Wahrscheinlich spielen beide Mechanismen, Blockierung des Prostaglandinstoffwechsels über Cox-2 und cox-unabhängige Wirkungen auf die Zellproliferation und Apoptose, eine Rolle bei der präventiven Wirkung von NSAIDs auf die kolorektale Karzinogenese (Rigas und Schiff 1999). Ein möglicher, cox-unabhängiger, in die Apoptoseregulation eingreifender Mechanismus der Acetylsalicylsäure stellt die Blockierung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B dar (s.u.) (Kopp und Gosh 1994).

1.3 Apoptose- und Zellzyklusregulation

Apoptose

In einem komplexen vielzelligen Organismus müssen für eine normale Entwicklung und für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase in Geweben mit Zellumsatz, wie dem Magen-Darm-Kanal, jene Zellen, welche irreparabel beschädigt, infiziert oder verbraucht sind, eliminiert werden. Als Apoptose wird ein Prozess bezeichnet, bei dem die Zelle bestimmte Schritte eines vorgegebenen Programms durchläuft an dessen Ende der Zelltod steht. Morphologisch charakterisiert wird die Apoptose durch eine Kondensation des Zellchromatins, einer DNA-Fragmentation, sowie einer zytoplasmatischen Bläschenbildung und Schrumpfung der Zelle (Hass, Busche et al. 1997).

Ausgelöst wird dieser Prozess durch intra- oder extrazelluläre Signale. Störungen im Ablauf des programmierten Zelltodes können zur Entwicklung von malignen, autoimmunen oder degenerativen Erkrankungen beitragen (Yang und Korsmeyer 1996). Die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms geht mit einer Blockierung der Apoptose einher (Bedi, Pasricha et al. 1995).

Maßgeblich an der Regulation der Apoptose sind Proteine der Bcl-2 Familie beteiligt (zusammengestellt von Reed 1997). Die Bcl-2 Proteinfamilie reguliert einen durch die Evolution konservierten Signalweg des programmierten Zelltodes (Adams und Cory 1998). Einige der strukturell verwandten Mitglieder

dieser Proteingruppe blockieren die Apoptose, wie Bcl-2, Bcl-X_L und Mcl-1, wohingegen andere den Ablauf des programmierten Zelltodes begünstigen, wie etwa Bak, Bax, Bad und Bcl-X_s. Die Proteine der Bcl-2 Familie treten miteinander in Wechselwirkung und bilden ein System aus Homo- und Heterodimeren (Oltvai, Milliman et al. 1993). Je nach Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptischen Proteine der Bcl-2-Familie in der Zelle kommt es zu einem Überleben der Zelle oder zum Übergang in die Apoptose (Kiefer, Brauer et al. 1995). Eine erhöhte Expression anti-apoptischer Faktoren ist verknüpft mit einem Block des natürlichen Zelltodes und einer erhöhten Malignität der Zelle (Krajewska, Moss et al. 1996; Yang und Korsmeyer 1996). Zusätzlich moduliert das Verhältnis der apoptoseregulierenden Proteine untereinander die Sensitivität von Karzinomzellen auf eine chemotherapeutische Behandlung (zusammengestellt durch Krajewska, Moss et al. 1996). Mit der Identifizierung des Bcl-2 Onkogens wurde das Konzept der Inhibition des physiologischen Zelltodes als einem zentralen Schritt in der malignen Transformation einer Zelle entdeckt. Die Überexpression von Bcl-2 in T- oder B-Lymphozyten führt zur Entwicklung von malignen Lymphomen. Je höher die Expression des Bcl-2 Proteins, desto schlechter ist das Ansprechen des Tumors auf Chemotherapie (Yang und Korsmeyer 1996).

Intrazellulär sind die Proteine der Bcl-2 Familie u.a. an den Membranoberflächen der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran lokalisiert. Da strukturelle Ähnlichkeiten des Bcl-X_L-Proteins mit dem Diphtherietoxin-Protein bestehen, wird angenommen, dass die Proteine der Bcl-2-Proteinfamilie wie auch das Toxin in Membranen als porenformende Kanalproteine fungieren können. Durch jene Poren können Faktoren wie Cytochrom-C oder Apaf-1 (apoptosis-activating factor-1) ins Zytosol freigesetzt werden (Green und Reed 1998). Im Zytosol aktivieren die freigesetzten Substanzen und Faktoren Proteinasen welche sonst in inaktiver Form vorliegen. Diese als Caspasen bezeichneten Proteinasen zerschneiden schliesslich weitere Zellproteine und die Zelle geht in das Stadium der Apoptose über (Thornberry und Lazebnik 1998). Gleichzeitig können aber auch einzelne Bcl-2-Proteine wie Bax die Apoptose unabhängig von der Aktivierung von

Caspasen auslösen. Weiterhin ist es anderen Faktoren der Bcl-2-Gruppe möglich, die Caspasen direkt, ohne vorherige Porenbildung an Membranen zu aktivieren (Reed 1997; Thornberry und Lazebnik 1998). Die Wirkungen der anti-apoptotischen Faktoren umfassen die Verhinderung der Freisetzung von Substanzen aus Mitochondrien, Verhinderung der Aktivierung von Caspasen und Neutralisierung pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie (Abb. 1). Extrazelluläre anti-apoptotische Faktoren, wie IL-3, bewirken eine Phosphorylierung von pro-apoptotischen Faktoren, wie Bad, welche dann, gebunden an das 14-3-3-Protein, inaktiv im Zytoplasma vorliegen (Korsmeyer 1999).

Mutationen in Genen, welche die Expression von pro- oder anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern steuern, haben einen Einfluss auf die Karzinogenese und maligne Transformation von Zellen. Bax, ein pro-apoptotisches Protein wird in seiner Expression u.a. von p53 gesteuert. Störungen und Mutationen im p53-Gen gehören zu den am häufigsten gefundenen Mutationen bei humanen Karzinomen (Miyashita und Reed 1995). Bei Mutationen im p53-Gen fehlt der Zelle die Möglichkeit über eine Induktion der Expression von Bax in die Apoptose überzugehen.

Im Kolon lässt die unterschiedliche Verteilung von Bcl-2 und Bax innerhalb der Krypte vermuten, dass sie für die Kontrolle der Apoptose im Kolonepithel von Bedeutung sind. Bcl-2 wird im unteren Abschnitt der Krypte vorrangig exprimiert, während Bax eine umgekehrte Verteilung hat, mit dem Hauptanteil der Expression im oberen Abschnitt der Krypte, wo die Zellen ihre Proliferation einstellen (Hague, Moorghen et al. 1994; Krajewski, Krajewski et al. 1994). Ein weiteres pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie ist Bak, welches im normalen Kolonepithel, und hierbei vor allem an der Spitze der Krypte, exprimiert wird (Kiefer, Brauer et al. 1995; Krajewska, Moss et al. 1996; Moss, Agarwal et al. 1996).

Butyrat scheint über eine Steigerung der Expression pro-apoptotischer und eine Senkung anti-apoptotischer Faktoren der Bcl-2 Proteinfamilie seine Wirkung auf Kolonkarzinomzellen zu vermitteln (Moss, Agarwal et al. 1996). Eine Blockierung der Synthese der durch Butyrat induzierten pro-apoptotischen

Faktoren, oder der nachfolgenden Caspasenaktivierung hebt die Butyratwirkung auf (Ruemmele, Dionne et al. 1999). Gleichzeitig erleichtert Butyrat aber auch die Auslösung der Apoptose über bestimmte Oberflächenproteine, wie den Fas-Komplex (Bonnotte, Favre et al. 1998; Giardina, Boulares et al. 1999). Ob Acetylsalicylsäure ebenfalls einen Einfluss auf Faktoren der Bcl-2 Familie hat, ist noch nicht geklärt.

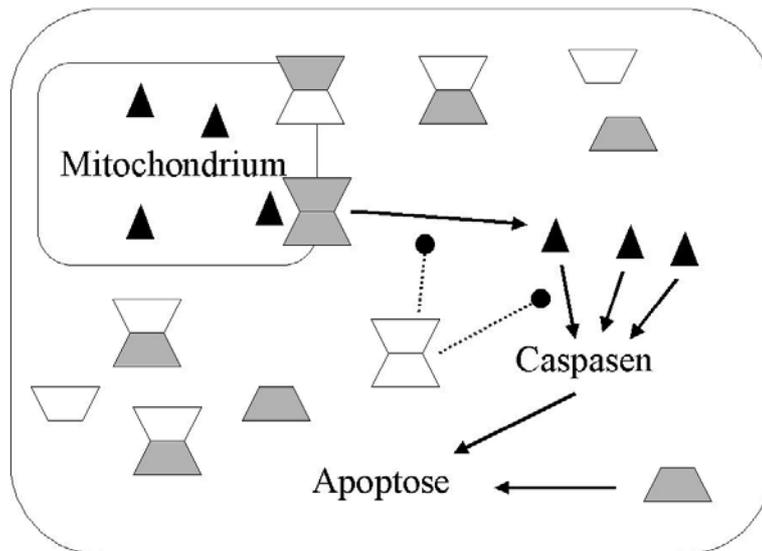


Abb. 1. Die Apoptosekontrolle durch Faktoren der Bcl-2-Proteinfamilie. Verschiedene pro- und anti-apoptotisch wirkende Proteine bilden Homo- und Heterodimere. Bei Überwiegen von pro-apoptotischen Proteinen kommt es zu Porenbildung an Mitochondrien, wobei Substanzen ins Zytoplasma gelangen, welche die Apoptosekaskade auslösen. (▲ : Cytochrom C, Apaf-1 u.a. mitochondriale Faktoren; ▽ : Anti-apoptotische Faktoren: Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 u.a.; ▽ : Pro-apoptotische Faktoren: Bak, Bad, Bcl-X_S u.a.; → : Aktivierung; ● : Blockierung).

Zusätzlich spielen bestimmte Transkriptionsfaktoren ebenfalls eine Rolle bei der Kontrolle der Apoptoseregulation. NF κ B (nuclear factor kappa B) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher u.a. die Reaktion einer Kolonepithelzelle auf bestimmte Signalstoffe, wie TNF α , verschiedene Interleukine oder Lipopolysaccharide, reguliert. Unter dem Begriff NF κ B wird eine Proteinfamilie zusammengefasst, deren Mitglieder nach Homo- und Heterodimerbildung sich an die DNA einer Zelle anlagern, was in der Aktivierung der Expression verschiedener Gene resultiert (Baeuerle und Baltimore 1996). NF κ B liegt

normalerweise im Zytoplasma vor, wo es an eine Gruppe von inhibierenden Proteinen, $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$ u.a., gebunden ist. Die $I\kappa B$ -Proteine verhindern die Translokation des aktiven $NF\kappa B$ in den Zellkern, indem sie den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma halten. Bei der Stimulation der Zelle mit oben genannten Signalstoffen kommt es durch Aktivierung von Kinasen zur Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ und dessen nachfolgenden Degradation, was in der Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors $NF\kappa B$ in den Zellkern führt. Der $NF\kappa B$ -Signalweg ist weiterhin an der Kontrolle der Zellproliferation und Apoptose beteiligt (Beg, Sha et al. 1995; Beg und Baltimore 1996; Wang, Mayo et al. 1996). Die Tatsache, dass in den Nuclei von Tumorzellen erhöhte $NF\kappa B$ -Spiegel gefunden werden, legt den Verdacht nahe, dass die Aktivierung dieses Faktors bei der Stimulation der Zellproliferation und Blockierung der Apoptose eine Rolle spielen könnte (Sovak, Bellas et al. 1997). Aktiviertes $NF\kappa B$ inhibiert in Fibroblasten, Makrophagen und Fibrosarkomzellen eine Induktion von Apoptose (Beg und Baltimore 1996; Wang, Mayo et al. 1996). Die Blockierung der Translokation von $NF\kappa B$ verstärkt die apoptoseinduzierende Wirkung von $TNF\alpha$ in Pankreaszellen (McDade, Perugini et al. 1999). Acetylsalicylsäure und Salicylate können die Aktivierung von $NF\kappa B$ durch eine Blockierung der Phosphorylierung von $I\kappa B$ verhindern (Kopp und Gosh 1994). Auch andere NSAID, wie Sulindac, blockieren die Translokation des aktiven $NF\kappa B$ in Kolonkarzinomzellen und begünstigen hierdurch möglicherweise ihre pro-apoptotische Wirkung (Yamamoto, Yin et al. 1999). Inwieweit Butyrat in den $NF\kappa B$ -Signalweg eingreift, ist noch weitgehend ungeklärt.

Zellzykluskontrolle

Der überwiegende Anteil humaner Zellen durchläuft eine Reihe von mitotischen Zellteilungen bevor sie endgültig differenzieren oder in die Apoptose gehen. Der Zellzyklus besteht aus der kurzen mitotischen Phase (M-Phase) und einer langen Interphase, welche die S-Phase, die Phase der DNA-Synthese, die Phase zwischen M-Phase und S-Phase (G_1) und die Phase zwischen S- und M-Phase (G_2) umfasst. Normalerweise gehen die Zellen nur dann in die M-Phase

über, wenn sie in die Mitose, also die Zellteilung, gehen, anderenfalls verbleiben sie in einer Ruhephase, welche als G_0 bezeichnet wird. Essentiell für den Zellzyklus ist die fehlerfreie Replikation der DNA der Zelle in der S-Phase und die Verteilung der identischen Chromosomenkopien auf die zwei Tochterzellen in der M-Phase. Während der G_1 -Phase steuern extrazelluläre Signale den Übergang der Zelle in eine neue Teilung oder den Verbleib in G_0 . Vor der Teilung passiert die Zelle einen als "restriction point" bezeichneten Zeitpunkt im Zellzyklus in der späten G_1 -Phase (Sherr 1996). Hiernach sprechen die Zellen nicht mehr auf extrazelluläre Signale an und bewegen sich autonom im Zellzyklus fort. Vor Erreichen des "restriction point" sind für die ordnungsgemäße Zellteilung sogenannte "check-points" von großer Wichtigkeit, da sie garantieren, dass bestimmte Abläufe im Zellzyklus abgeschlossen sind, bevor die Zelle in eine neue Zellzyklusphase übertritt. An den "check-points" fällt die Entscheidung, ob eine Zelle weiter proliferiert oder in die Apoptose übergeht. Indem die Zelle solche Kontrollpunkte nutzt, garantiert sie die Stabilität ihres genetischen Materials (Sherr 1996). Ein Charakteristikum malignen Zellwachstums ist eine unkontrollierte Zellproliferation. Tumorzellen zeigen typischerweise Fehler in jenen Genen, welche ihren Zellzyklus regulieren. Insbesondere finden sich in malignen Zellen häufig Schäden in Genen, welche an der Kontrolle des "restriction point" oder der "check points" beteiligt sind.

Der "restriction point" wird durch mehrere Gene reguliert. Dabei spielt das Retinoblastoma-Tumorsuppressorgen (Rb) eine Schlüsselrolle. Die Aktivität des Rb-Proteins (pRb) wird durch Zyklen wechselnder Phosphorylierung und De-Phosphorylierung reguliert (Weinberg 1997). Das dephosphorylierte pRb verhindert einen verfrühten Übergang von der G_1 -Phase nach S durch Interaktion mit mehreren zellulären Proteinen, u.a. mit dem Transkriptionsfaktor E2F dessen Funktion für die Aktivierung von Genen, welche für die DNA-Replikation in der S-Phase wichtig sind, von Bedeutung ist. Die Phosphorylierung von pRb andererseits verhindert die Aktivierung des Proteins und erlaubt das Durchlaufen des "restriction points" in G_1 durch die Aktivierung von E2F. Die pRb-Phosphorylierung wird hauptsächlich durch Cyclin D-

abhängige Kinasen (cdk4 und cdk6) kontrolliert, deren Aktivität wiederum nicht nur von der Bindung von Cyclinen, wie z. B. Cyclin D1, abhängig ist, sondern auch durch Inhibitoren der cdk's verhindert werden kann (Abb. 2). Cdk-Inhibitoren der INK4-Proteinfamilie (p15, p16, p18 und p19) binden hauptsächlich an cdk4 und cdk6, während die Mitglieder der Kip-Familie ($p21^{Waf1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{kip2}$) ein breiteres Spektrum an cdk's blockieren, wie etwa cdk2, welches mit den Cyclinen E und A einen Komplex bildet (Harper, Elledge et al. 1995). Gerade jener cdk2-Cyclin E-Komplex fördert sonst eine autonome Phosphorylierung von pRb und führt damit zu einer irreversiblen Passage des G₁-"restriction points".

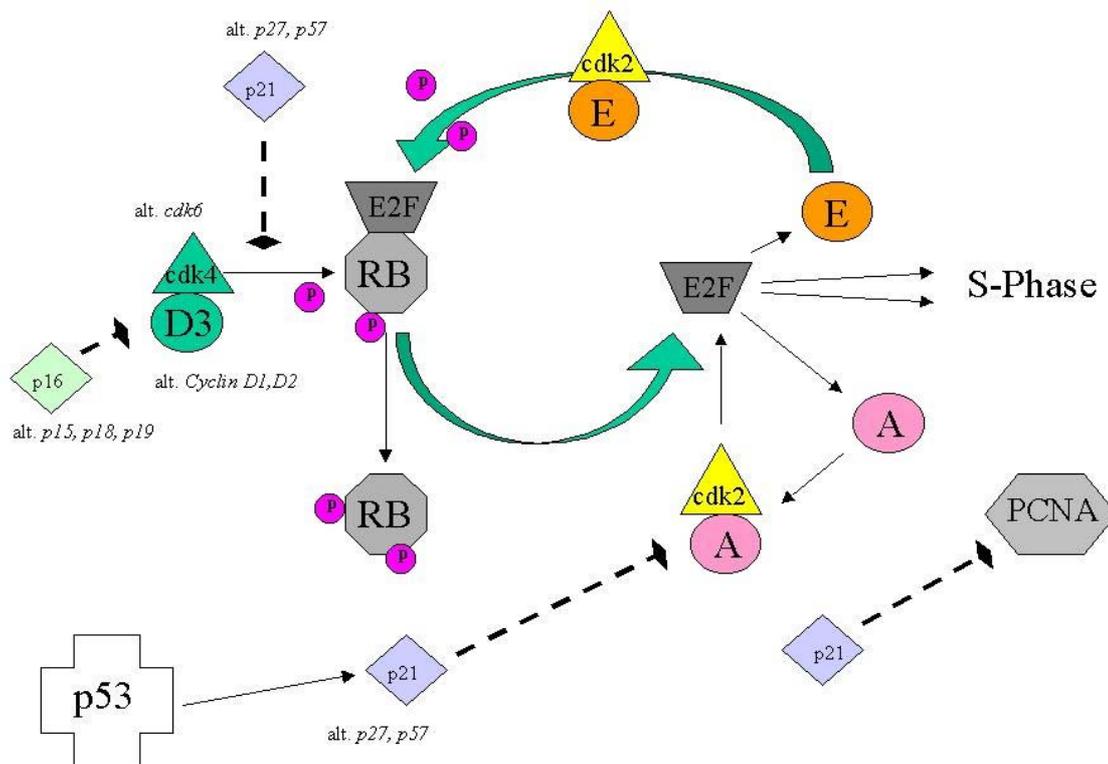


Abb. 2. Kontrolle des Restriktionspunktes. Durch die Phosphorylierung von RB kommt es zur Lösung von E2F, welches verschiedene DNA-Replikationsenzyme und u.a. auch Cyclin A und E induziert. Cyclin A/E induziert als Komplex mit cdk2 wiederum E2F sowie die Phosphorylierung von RB, was zu einem weiteren Fortschreiten im Zellzyklus beiträgt. Die Proteine der INK4-Familie, sowie das durch p53 induzierte $p21^{Waf1/Cip1}$ blockieren den Zellzyklus durch Interaktion mit verschiedenen Cyclinen, cyclin-abhängigen Kinasen und PCNA.

Die Expression des p21^{Waf1/Cip1}-Proteins wird vom p53-Gen kontrolliert. p53 wird bei Registrierung von Schäden in der DNA aktiviert, wobei sein genauer Aktivierungsmechanismus noch nicht geklärt ist. In Folge seiner Expressionserhöhung aktiviert es p21^{Waf1/Cip1} und es wird angenommen, dass die Blockierung von Cyclin D1/cdk4, Cyclin E/cdk2 und Cyclin A/cdk2-Komplexen durch p21^{Waf1/Cip1} einen Mechanismus darstellt, wie der Zellzyklus in G1 abgebremst und eine Replikation der DNA verhindert werden kann (Harper, Elledge et al. 1995). Zusätzlich interagiert p21^{Waf1/Cip1} direkt mit PCNA, einem Kofaktor der DNA-Polymerase δ , was zu einem Block der PCNA-abhängigen DNA Synthese führt (Cayrol, Knibiehler et al. 1998). Der durch p21^{Waf1/Cip1} induzierte Zellzyklusblock bietet der Zelle Zeit zur Reparatur ihrer DNA, wobei gadd45 ein durch p53 induziertes Genprodukt mit DNA-Reparatur-Funktion darstellt (Levine 1997). Im Falle einer irreparablen DNA-Schädigung kann p53 den programmierten Zelltod in der betroffenen Zelle durch Aktivierung von proapoptischen Genen wie Bax auslösen (Miyashita und Reed 1995).

Zusammengefasst bleiben der Zelle also zwei alternative Auswege in der späten G₁-Phase bei beschädigter DNA: Blockierung des Zellzyklus in G₁ und Reparatur der DNA oder Übergang in die Apoptose. Der programmierte Zelltod stellt dabei die effektivste natürliche Verteidigungsmassnahme gegen eine maligne Entartung der Zelle dar, da hierbei entartete Zellen vor Eintritt in die S-Phase eliminiert werden (Sherr 1996). Krebszellen verbleiben in einem ständigen Zyklus von Proliferation und Teilung, während die Zellreifung und terminale Differenzierung in der G₀-Phase ein Ausscheren aus dem Zellzyklus voraussetzt. Insbesondere p21^{Waf1/Cip1} scheint dabei eine wichtige Rolle zuzukommen, da es durch Substanzen, welche die Differenzierung von Zellen fördern, unter Umgehung der Regulation durch p53 induziert wird (Steinman, Hoffman et al. 1994).

Butyrat zeigt im Zellkulturexperiment einen Einfluss auf verschiedene Faktoren des Zellzyklus. In humanen Kolonkarzinomzellen kommt es unter Butyratinkubation zu einem Block des Zellzyklus in der G₁-Phase (Janson, Brandner et al. 1997). Das Expressionsmuster von Faktoren der Zellzykluskontrolle, wie Cyclinen und cyclin-abhängigen Kinasen wird durch

Butyrinkubation verändert (Siavoshian, Blottiere et al. 1997). Gleichzeitig zeigen sich ebenso Veränderungen in der Expression von zellzykluskontrollierenden Faktoren, wie p53 und p21^{Waf1/Cip1} bzw. p27^{kip1} (Palmer, Paraskeva et al. 1997; Archer, Meng et al. 1998). Wie Butyrat weist auch Acetylsalicylsäure einen Einfluss auf verschiedene Faktoren, welche an der Zellzyklusregulation beteiligt sind auf, und blockiert den Zellzyklus in G₀/G₁ (Shiff, Koutsos et al. 1996).

1.4 Ziele der vorliegenden Untersuchungen

Butyrat und Acetylsalicylsäure beeinflussen das Wachstum von Kolonkarzinomzellen. Über ihre potentielle Interaktion bei gleichzeitiger Applikation ist bis heute nichts bekannt. Die Ziele der vorliegenden Dissertation waren deshalb die Untersuchung des Einflusses von Butyrat und Acetylsalicylsäure auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von humanen Kolonkarzinomzellen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Kombination von Butyrat und Acetylsalicylsäure eine im Vergleich zu den Einzelsubstanzen verstärkte Wirkung auf die untersuchten Zellen ausüben kann. Ein weiteres Ziel stellte die Charakterisierung von Veränderungen der Expression von zellzyklus- und apoptoseregulierenden Faktoren unter Butyrat- und Acetylsalicylsäurebehandlung dar. Auch hier wurden Faktoren gesucht, auf welche die Kombination von Acetylsalicylsäure und Butyrat einen verstärkten Effekt aufweisen kann. In diesem Zusammenhang sollte zudem die Wirkung von Butyrat auf die Aktivierung von NF κ B untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1. Zelllinien und Kulturmedien

Zwei kolorektale Karzinomzelllinien wurden untersucht. Die HT-29-Zelllinie (ATCC HTB-38) wurde 1964 von J. Fogh aus einem entdifferenzierten Kolonkarzinom einer 44-jährigen Patientin isoliert (Fogh 1975). Caco-2-Zellen (ATCC HTB-37) sind humane Zellen einer kolorektalen Adenokarzinomzelllinie, welche aus einem Kolonkarzinom eines 72-jährigen Patienten isoliert wurden (Fogh 1977). Der Differenzierungsgrad von Caco-2 Zellen ist höher als von HT-29 Zellen. Beide Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) bezogen.

HT-29 und Caco-2 Zellen wurden bei 37⁰C und 5% CO₂ Begasung (Heraeus-Brutschrank B5060, Heraeus, Hanau) in 10% FBS Medium inkubiert (L-Glutamin 1%, Penicillin/Streptomycin 2%, NEAA 1%, Hepes Buffer 0,4% in Minimum Essential Medium, alle: Life Technologies, Paisley, UK).

2.1.2. Zellkulturversuche

1 x 10⁷ Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen (Costar, Cambridge MA, USA) ausgesät und bei 37⁰C für 72h inkubiert. Um eine Zellwachstumssynchronisation zu erreichen, wurden die Zellen dann 6h in serumfreien Medium inkubiert. Nach Ersatz des serumfreien Mediums durch 10% FBS-Medium und weiteren 12h Inkubation, wurden die Zellen sodann unter Zugabe der Testsubstanzen für bis zu 72h inkubiert.

Die getesteten Substanzen (Konzentrationen) umfassten je Butyrat (HT-29: 1-5 mM; Caco-2: 2-5 mM) und Acetylsalicylsäure (1-3 mM) alleine, sowie Kombinationen von beiden in unterschiedlichen Konzentrationen (But 1-3mM+ASS1mM, But 2mM+ASS 2mM, ASS 1-3mM+But 1mM). HT-29 Zellen wurden zusätzlich noch in Acetylsalicylsäure 5mM und Butyrat 6-8mM inkubiert. Als Lösungsmittel in der Stammlösung diente für Butyrat Aqua dest., für Acetylsalicylsäure 96% Ethanol (Malinckrodt Baker BV, VA Deuter, Holland). Als Kontrollsubstanzen wurden für die Butyratinkubationsexperimente

äquimolare Natriumchloridlösungen, für die Acetylsalicylsäure-inkubationsversuche 1-3millimolare Ethanollösungen verwendet. Als Kontrollsubstanzen bei Inkubation in der Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination dienten Ethanol-NaCl-Lösungen. Schließlich wurden die Zellen in Zellkulturmedium ohne Zusatz inkubiert um einen Effekt der Kontrollsubstanzen auf Zellwachstum etc. auszuschließen. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Zum Zeitpunkt 0h, 24h, 48h, 72h wurde der Medienüberstand abpipettiert und die adhärent wachsenden Zellen durch Trypsinierung vom Kulturflaschenboden abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit 5ml PBS (PBS Dulbeccos's, Life Technologies) gewaschen, 4ml Trypsin (Trypsin-EDTA 1%, Life Technologies) in die Kulturflasche gegeben und dies nach einigen Sekunden wieder abgesaugt. Nach erneuter Zugabe von Trypsin (3ml) und fünfminütiger Inkubation bei 37⁰C, wurden die Zellen durch Beklopfen der Zellkulturflasche von der Unterlage abgelöst und die Trypsinierungsreaktion durch Zugabe von 7,5ml 10% FBS-Medium gestoppt. 0,5ml dieser Suspension wurde für die Zellzählung und Trypanfärbung entnommen, die restlichen Zellen für 10min bei 4⁰C mit 900RPM zentrifugiert (Labofuge 400R, Kendro, Hanau). Nach Verwerfen des Überstands und Resuspension des entstandenen Zellpellets in 10ml PBS wurde erneut für 10min bei 4⁰C mit 900RPM zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Das Zellpellet wurde schliesslich in 1ml PBS resuspendiert, in ein silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäss (Sorenson, West Salt Lake City, Utah, USA) überführt, zentrifugiert (10min, 4⁰C, 12000RPM) das Zellpellet in flüssigem N₂ schockgefroren, bei – 80⁰C gelagert und die Zellen im Western-Blot weiter analysiert.

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

Ins Medium abgeschilferte Zellen wurden nach Zentrifugation des Zellkulturmedienüberstands (10min, 4⁰C, 900RPM) und Resuspension des

entstandenen Zellpellets in 1ml PBS getrennt von den adhären Zellen gezählt. 100µl des Resuspendats wurden hierzu mit 100µl Trypanblau gemischt und vitale und avitale Zellen bei der Zellzählung in der Neubauerkammer unterschieden. Nach Überführung in ein silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß, Zentrifugation bei 4°C (10min, 4000RPM) und Abpipettieren des Überstands wurde das Zellpellet ebenfalls in flüssigem N₂ schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

2.2 Zelldifferenzierungsversuche

HT-29- (5×10^4 Zellen) und Caco-2-Zellen (6×10^4 Zellen) wurden in 25 cm² Kulturflaschen (Costar, Cambridge MA, USA) ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ Begasung für 24h inkubiert. Zum Zeitpunkt 0h wurde der Mediumüberstand bei –20°C eingefroren und die Zellen dann in Butyrat (1mM), Acetylsalicylsäure (1mM), einer Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination (1mM+1mM), Medium ohne Zusatz und einer Ethanol-NaCl-Kombination (1mM+1mM) für bis zu 11 Tage (264h) inkubiert. An jedem Zeitpunkt wurde Mediumüberstand gewonnen und bei –20°C eingefroren. Der Gehalt an carcinoembryonalem Antigen (CEA) im Medium wurde mit Hilfe eines immunradiometrischen Assays gemessen (ELSA2-CEA, CIS bio international, ORIS group, Cedex, Frankreich). Im einzelnen wurden 300µl Jod¹²⁵-markierter Anti-CEA-Antikörper mit 100µl der zu messenden Probe in einem Well einer Anti-CEA-beschichteten 96-well-Platte vermischt. Nach 3h Inkubation bei 45°C und drei Waschvorgängen (je 2 min) mit Aqua dest. 0,3% Tween 20 wurde mittels eines γ-Counters (CB 2111, Bertold GmbH, Wildbad) die Aktivität des im Reaktionsgefäß gebundenen Jod¹²⁵ gemessen und der CEA-Gehalt anhand einer Standardkurve berechnet.

2.3 Zellstimulationsversuche

Um den Einfluss von Butyrat auf die NF- κ B Signaltransduktionskaskade näher zu charakterisieren wurde die humane Adenokarzinomzelllinie HeLa (ATCC CCL-2.1) als In-vitro-Modell verwendet. Hierzu wurden HeLa Zellen ($2,5 \times 10^5$) in 25cm^2 Kulturflaschen (Costar, Cambridge MA, USA) ausgesät und bei 37°C für 72h inkubiert. Nach Mediumwechsel (10% FBS DMEM-Medium mit L-Glutamin 1%, Penicillin/Streptomycin, alle: Life Technologies, Paisley, UK) und weiteren 24h Inkubation erfolgte eine Inkubation unter Zusatz von Butyrat (4-5mM) über 48h. Als Kontrolle wurden die Zellen in Medium ohne Butyratzusatz inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen 2, 5, 10, 30 und 60 Minuten lang durch Zugabe des exogenen Entzündungsmediators $\text{TNF}\alpha$ (2000 U/ml; Sigma) stimuliert, trypsinisiert und im Western Blot analysiert.

2.4 Western Blot

Zur Analyse von Faktoren der Zellzyklus- und Apoptosekontrolle wurde ein Western-Blot-System und spezifische Primärantikörper etabliert.

2.4.1. SDS-PAGE, Blotting und Färbung

Die Zellpellets wurden in $200\mu\text{L}$ 4°C kaltem Lysis buffer (Tris-HCL 20mM, EGTA 1mM, Na_3VO_4 $50\mu\text{M}$, NaF 50mM, Aprotinin 0.01 U/mL, Leupeptin $1\mu\text{g/ml}$, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) $1\mu\text{M}$, Elastinal 1mM, Pepstatin $10\mu\text{g/mL}$ (pH 7,4; alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, Steinheim, außer Tris-HCL, Merck, Darmstadt)) gelöst und danach für 10 Sekunden ultraschallbehandelt (Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin). Die Lysate wurden dann bei 4°C für 5 Minuten bei 7500 U/min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415) und der Überstand in ein neues, silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäss überführt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde photometrisch bei 750 nm (BioRad DC Protein Assay, BioRad, Hercules CA, USA; Tecan-Spectra-Spektroskop,

Tecan, Crailsheim) gegen eine Rinderalbumin-Standardkurve (BSA Fraction V, Boehringer / Mannheim) ermittelt. 70µl Sample buffer (Glycerol 10%, Laurylsulfat (SDS) 0,4%, 0,3% Bromphenolblau und 0,2% Pyronin Y (alle: Sigma) in 1x Stacking Buffer (Trisbase 0,5M/L, 0,8% SDS) und 20% 2-Mercapto-ethanol (Sigma)) wurden zu den Lysaten gegeben, durch Vortexbehandlung mit der Probe vermischt, diese 3 Minuten lang auf 95⁰C erhitzt und danach 5min auf Eis gekühlt. Proteinproben (10-50µg pro lane) wurden dann mittels SDS-PAGE (Protean II Cell, BioRad) aufgetrennt, wobei die Polyacrylamidkonzentration (Boehringer / Mannheim) je nach Größe des zu bestimmendem Proteins zwischen 10 bis 15% lag. Je höher das Molekulargewicht des gesuchten Proteins dabei war, desto niedriger wurde die Polyacrylamidkonzentration im Gel gewählt.

Zusätzlich wurde in mindestens eine Geltasche 10-15µl eines farblich markierten standardisierten Proteingrößenmarkers (SDS-PAGE Standards, BioRad) geladen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch auf eine PVDF-Membran (Immobilion-membrane, Milipore, Bedford MA, USA) mittels Elektroblothing bei 400-650mA überführt (Trans Blot System, BioRad; EC-Apparatus EC140, EC-Apparatus Co., Holbrook NY, USA). Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch 5% Trockenmilchpuffer (5% Trockenmilchpulver (Fluka-BioChemika, Buchs, CH), 0,1% Tween 20 (Sigma), 0,1% Natriumazid (Merck) in TBS (10mM Tris-HCL, 150mM NaCl (Merck)) über Nacht bei 4⁰C oder 2h bei RT und Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20 (3 x 30sec, 1 x 10min) wurde der Primärantikörper aufgetragen und die Membran für zwei bis drei Stunden (siehe Tab. I) inkubiert. Darauf folgten mehrere Waschgänge mit TBS 0,1% Tween 20 (3 x 30sec, 3 x 15min), ein weiterer Blockierungsschritt in 5% Milchpuffer (30min) Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20 (2 x 30sec, 1 x 10min) die Inkubation der Blothingmembran mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Nach weiteren Waschungen (3 x 30sec, 2 x 15min) wurde der Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK) nachgewiesen. Bei dieser Nachweismethode kommt es zu einer HRP-katalysierten Oxidation von Diazylhydrazid und nachfolgender

Lichtemittierung, welche durch Belichtung von lichtsensitiven Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham) aufgezeichnet wurde. Die Belichtungszeiten lagen hierbei zwischen wenigen Sekunden bis mehreren Minuten (Abb. 3).

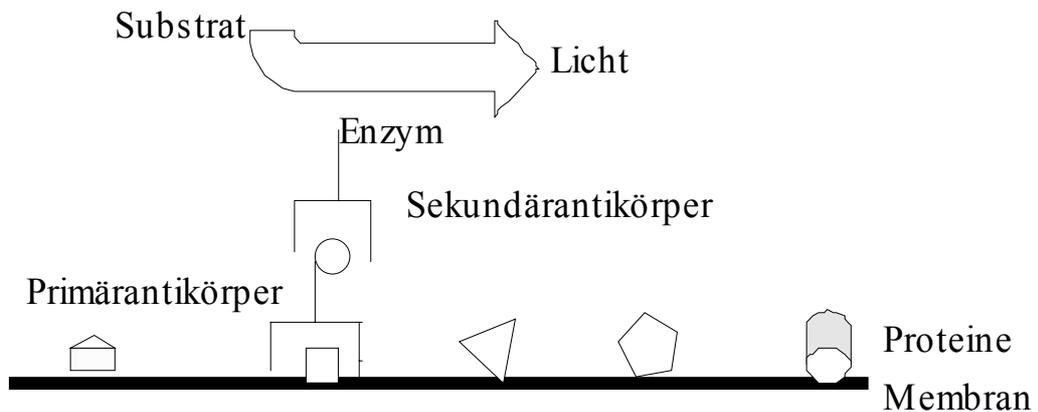


Abb. 3. Schematische Darstellung der Immunfärbung im Western-Blot.

Die Blottingmembranen wurden danach bei 4°C, luftdicht in Plastikfolie eingewickelt, aufbewahrt und gegebenenfalls weitere Male gefärbt. Hierzu wurde die Membran zur Ablösung gebundener Antikörper für 30 Minuten bei 65°C in Stripping Buffer (100mM 2-Mercaptoethanol, 2% Laurylsulfat, 62.5mM Tris-HCL, pH 6,7) inkubiert und anschließend mehrfach in TBS 0,1% Tween 20 (2 x 10min) gewaschen. Nach einem weiteren Blockierungsschritt in 5% Milchpuffer (1h, RT) konnte die PVDF-Membran mit einem anderen Primärantikörper gefärbt werden.

Um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Proteinbahnen zu überprüfen wurde die Blottingmembran direkt nach dem Blottingschritt oder nach der Antikörperfärbung nach Waschung in Aqua dest. mit Ponceau S (0,1% Ponceau S in 5% acetic acid, Sigma) angefärbt. Überschüssiges Ponceau S wurde durch mehrere Waschgänge in Aqua dest. entfernt. Nach Beurteilung der Proteinladung konnte die Membran mittels PBS 0,1% Tween 20 wieder entfärbt und weiteren Antikörperfärbungen zugeführt werden.

2.4.2. Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle I zusammengestellt. Sie stammten entweder von der Maus (mm) oder vom Kaninchen (rb). Die Antikörper wurden in der aufgeführten Konzentration in BSA-Puffer (6% BSA, 20mM Tris-HCL, 0,5mM NaCl, 0,1% Natriumazid, pH 7.5) gelöst und die Blottingmembran bei Raumtemperatur inkubiert. Der gegen Mausantikörper gerichtete, HRP-konjugierte Sekundärantikörper stammte vom Schaf, der gegen Kaninchenantikörper gerichtete sekundäre Antikörper vom Esel (beide: Amersham). Beide wurden in Konzentrationen von 1:2000 bis 1:5000 in TBS gelöst. Die Inkubationszeit des Sekundärantikörpers betrug eine Stunde.

2.5 *Statistische Analyse*

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

Der Student t-Test oder ANOVA-Tests (Analysis of variance) wurden eingesetzt, um die statistische Signifikanz zwischen Butyratinkubation (Acetylsalicylsäure-, bzw. der Kombination) und der Kontrolle zu berechnen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0.05$ angenommen. Die dargestellten Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei verschiedenen Experimenten.

Antigen	Masse	Typ	Herkunft	Klon	Verdünnung	Zeit	positive Kontrolle	2 ^o Antikörper
14-3-3ε	29kd	mm IgM	TL # F46820	12	1:1000	2h	HeLa	1:2500
Bak	23kd	mm IgG2a	ORP # AM03, Ab-1	TC-100	2,5µg/ml	3h	HeLa, HL-60	1:2500
Bcl-x_L	26kd	rb pAb	TL # B22630		1:1000	2h	MCF-7, HeLa, RSV3T3	1:2500
Cyclin D3	33kd	mm IgG2b	TL # 28620	1	1:500	3h	RSV3T3, HeLa	1:2500
Mcl-1	42/40kd	mm IgG1	TL # M54020	11	1:1000	2h	Mouse macrophage	1:2500
p16	16kd	mm IgG1	ORP # NA29, Ab-1	DCS-50.1/H4	2,0µg/ml	2h	HeLa, Saos2	1:5000
p21^{waf1/cip1}	21kd	mm IgG2a	TL # C24420	70	1:250	2h	Human Fibroblast Lysate	1:2500
p53	53kd	mm IgG2a	ORP # OP43, Ab-6	DO-1	0,1µg/ml	3h	HeLa, A 431, HT-29	1:5000
PCNA	37kd	mm IgG1	ORP # NA05, Ab-3	19A2	2,0µg/ml	2h	HeLa	1:2500
cdk2	33kd	rb pAb	PH # 15536E		1:1000	2h	HeLa, Jurkat	1:2500
phospho-IκBα	40kd	rb Ab	CAL # 400002		1:1000	o/n	HeLa, TNFα stimuliert	1:2500
IκBα	40kd	rb Ab	NEB #9242S		1:500	o/n	HeLa	1:2000

Tabelle I. Verwendete Antikörper im Western Blot.

(ORP: Oncogene Research Products, Cambridge MA, USA; TL: Transduction Laboratories, Lexington, UK;

NEB: New England Biolabs, Beverly MA, USA; PH: Pharmingen, San Diego CA, USA; CAL: Calbiochem, San Diego CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Butyrat und Acetylsalicylsäure auf die Proliferation und Apoptoseinduktion

3.1.1. Zellproliferation und Apoptoseinduktion

Hemmung der Zellproliferation

Die Zellen erreichten nach 72h Inkubationszeit in den verschiedenen Zellkulturmedien eine Konfluenz von 50-75%. Butyrat hemmte konzentrationsabhängig die Proliferation von HT-29 Zellen, als auch von Caco-2 Zellen, im Vergleich zur Kontrolle. Im einzelnen zeigte sich unter Butyrat (1mM) noch keine signifikante Proliferationshemmung. Inkubation mit Butyrat (2mM-5mM) resultierte in einer signifikanten Proliferationshemmung, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen. Erst Butyrat ($\geq 6\text{mM}$) zeigte eine signifikant höhere Proliferationshemmung im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen in HT-29 Zellen (alle: $p \leq 0.05$) (s. Abb. 4).

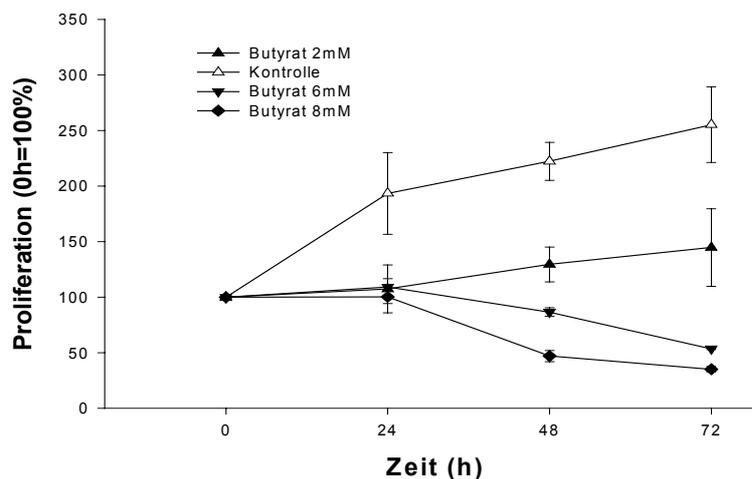


Abb. 4. Wachstumshemmung von HT-29 Zellen unter Butyratinkubation. Dargestellt ist das Verhältnis von adhären proliferierender, vitaler (Trypan neg.) Zellpopulation an den verschiedenen Zeitpunkten zur adhären wachsenden Zellzahl am Zeitpunkt 0h. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert (Standardabweichung) aus mindestens drei verschiedenen Experimenten.

In Caco-2 Zellen hemmte Butyrat (2mM) die Zellproliferation nach 24h Inkubation signifikant ($p=0.004$). Noch deutlicher wurde dieser Effekt nach 72h Inkubation ($p=0.003$). Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen der Proliferationshemmung mit Butyrat (2mM) und Butyrat (4mM) in Caco-2 Zellen festgestellt werden.

Unter Acetylsalicylsäureinkubation kam es im Vergleich zur Kontrolle ebenso zu einer Wachstumshemmung in beiden Zelllinien. Bei Inkubation von HT-29 Zellen mit Acetylsalicylsäure (1mM) kam es nach 24h zu einer signifikanten Proliferationshemmung im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.01$), was sich im weiteren Verlauf weiterhin bestätigte (48h Inkubation: $p=0.003$; 72h: $p=0.02$) (s. Abb. 5). Die Hemmung der Proliferation wurde durch eine höhere Acetylsalicylsäurekonzentration (3mM) signifikant verstärkt (24h Inkubation: $p=0.07$; 48h: $p=0.003$; 72h: $p=0.006$).

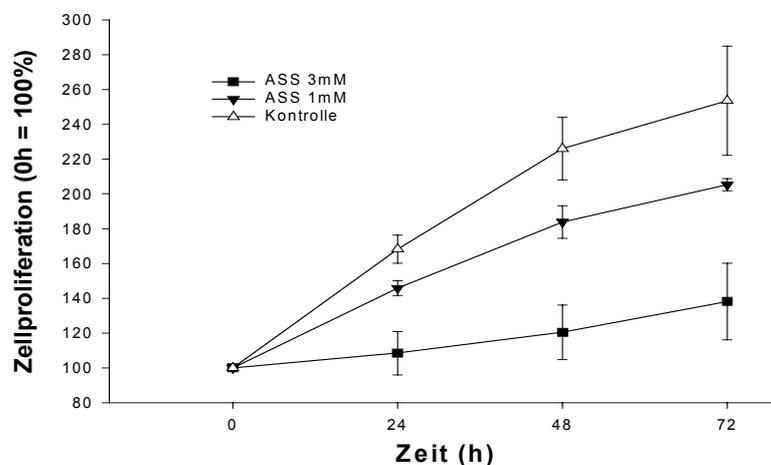


Abb. 5. Proliferationshemmung von HT-29 Zellen unter Acetylsalicylsäureinkubation (ASS). Dargestellt ist das Verhältnis von adhärent proliferierender Zellpopulation an den verschiedenen Zeitpunkten zur adhärent wachsenden Zellzahl am Zeitpunkt 0h. Die dargestellten Daten zeigen den Mittelwert (Standardabweichung) aus mindestens drei verschiedenen Experimenten.

In Caco-2 Zellen verminderte die Acetylsalicylsäureinkubation das Wachstum der Zellen signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach 72h ($p=0.003$). Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte bei 24h Inkubation beobachtet werden ($p=0.008$), nach 72h Inkubation mit Acetylsalicylsäure (3mM) wurde aber im Vergleich zu Acetylsalicylsäure (1mM) keine weitere Wachstumshemmung festgestellt und das Signifikanzniveau knapp verfehlt ($p=0.06$) (Abb. 6).

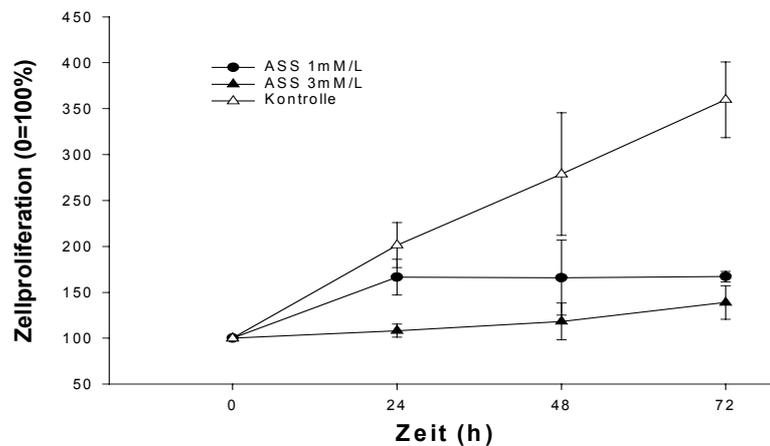


Abb. 6. Proliferationshemmung von Caco-2 Zellen unter Acetylsalicylsäureinkubation (ASS).

In Kombination zeigte sich eine verstärkte Proliferationshemmung durch die Kombination von Acetylsalicylsäure und Butyrat in HT-29 Kolonkarzinomzellen im Vergleich zur Wirkung der Einzelsubstanzen nach 72h Inkubation ($p \leq 0.001$) (Abb. 7).

Die Verstärkung der antiproliferativen Wirkung der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination im Vergleich zur Einzelinkubation konnte in Experimenten mit Caco-2 Zellen bestätigt werden (nicht dargestellt).

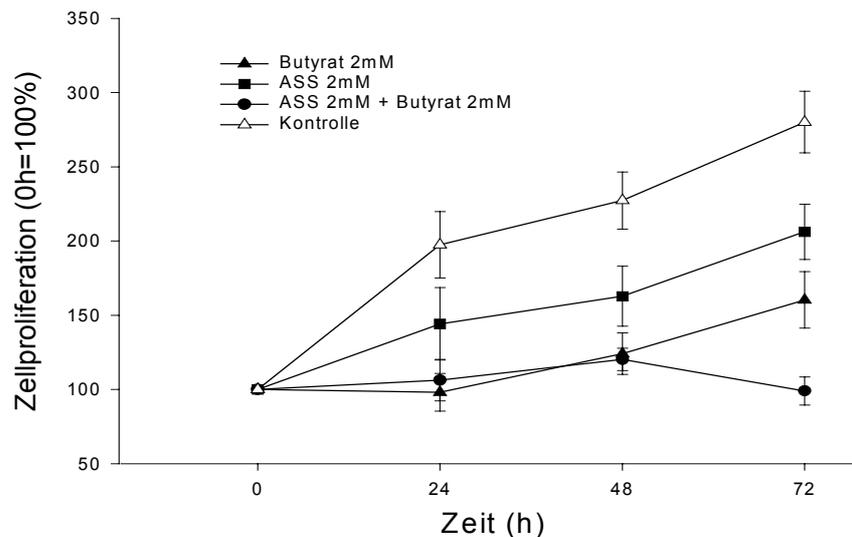


Abb. 7. Zellproliferation von HT-29 Zellen unter Butyrat- und Acetylsalicylsäureinkubation, sowie unter Zusatz einer Kombination von Acetylsalicylsäure (ASS) und Butyrat.

Induktion von Apoptose

Die Anzahl der im Medienüberstand flottierenden Zellen wurde als Maß für die Apoptoseinduktion genutzt. Die von der Kulturflasche abgelösten Zellen, war in buyrat-behandelten HT-29 Zellen höher als bei Inkubation mit der Kontrollsubstanz. Die Auslösung von Apoptose war hierbei abhängig von der Konzentration und der Inkubationszeit.

Inkubation mit Butyrat (1mM) resultierte in keiner signifikanten Apoptoseinduktion, Butyrat (2mM) zeigte nach 72h Inkubation einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen ($p=0.002$). Eine Erhöhung der Butyratkonzentration auf 4mM resultierte in keinem signifikanten Unterschied zur niedrigeren Konzentration (2mM), wohl aber in einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle bereits nach 48h ($p=0.02$).

Butyrat (5mM-8mM) schliesslich zeigte einen signifikanten, konzentrationsabhängigen Anstieg der apoptotischen Zellfraktion im Vergleich zur Kontrollsubstanz. Der Anteil der apoptotischen Zellen lag bei Inkubation mit Butyrat 5mM zwischen 14,4% (10,9-22,1%) nach 48h , sowie 14,9% (12,5-

24,0%) nach 72h im Vergleich zur Kontrolle mit 0,25% (0,1-0,6%) apoptotischen Zellen unter der 72-stündigen Inkubation (s. Abb. 8).

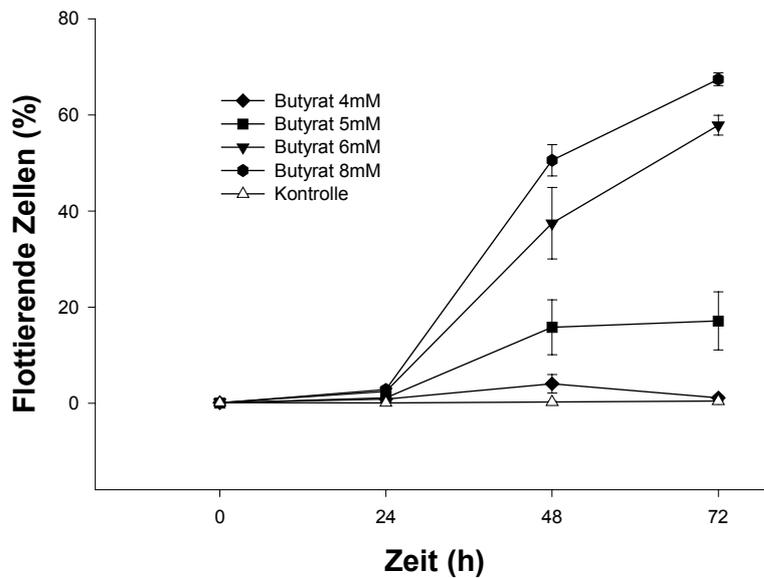


Abb. 8. Apoptoseinduktion durch Butyratinkubation in HT-29 Zellen. Dargestellt ist der Anteil der im Medium flottierenden, apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl.

Im Inkubationsexperiment mit Caco-2 Zellen kam es unter Butyratinkubation (2mM) nach 48h zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen (4,4% (1,9-5,5%) im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.01$). Eine Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes zeigte sich nach 72h Inkubation, mit signifikanten Unterschieden in der Apoptoseinduktion zwischen Butyrat (2mM) und Butyrat (3mM) ($p=0.01$), sowie zwischen Butyrat (3mM) und Butyrat (4mM) ($p=0.0001$).

Im Inkubationsversuch mit Acetylsalicylsäure zeigte sich ebenfalls ein Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen: In HT-29 Zellen konnte unter Acetylsalicylsäureinkubation (1mM) nach 48h ein signifikanter Anstieg der im Medium flottierenden Zellzahl beobachtet werden ($p=0.01$). Dieser Unterschied zur Kontrolle zeigte sich auch nach einer Inkubationsdauer von 72h ($p=0.01$).

Eine Erhöhung der Acetylsalicylsäurekonzentration auf 3mM zeigte keine signifikante Verstärkung der Acetylsalicylsäurewirkung, resultierte aber schon nach 24h in einer Erhöhung der apoptotischen Zellen auf 0,8% (0,4-0,9%) (Kontrolle 0,1% (0-0,1%)). Nach 48h erhöhte sich dieser Anteil auf 1,6% (1,1-3,6%) und nach 72h Inkubation auf 4,2% (1,9-9,0%) mit signifikanten Unterschieden zur Kontrollsubstanz ($p=0.03$ bzw. 0.04).

Acetylsalicylsäure in einer Konzentration von 5mM zeigte einen signifikanten Unterschied zu den niedrigeren Konzentrationen ab 48h Inkubationsdauer, mit einer Erhöhung des Anteils flottierender Zellen auf 24,5% (23,2-25,8%) nach 72h (s. Abb. 9).

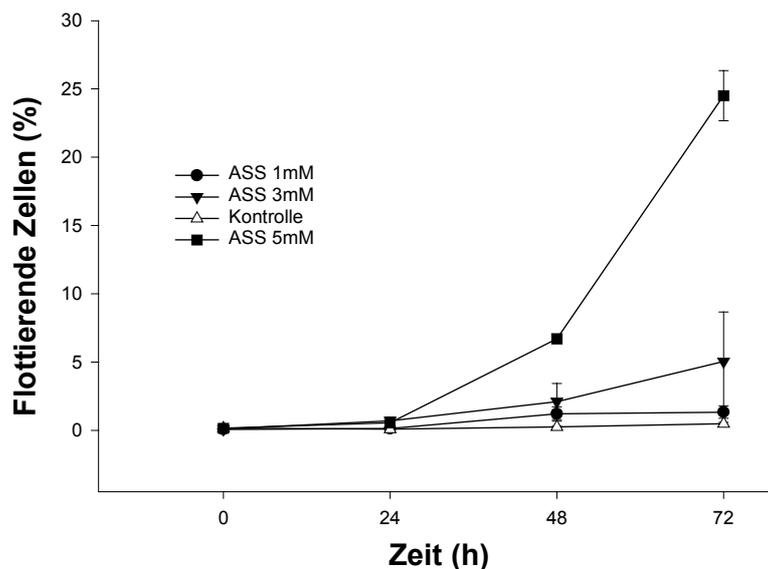


Abb. 9. Apoptoseinduktion durch Acetylsalicylsäureinkubation (ASS) in HT-29 Zellen. Dargestellt ist der Anteil der im Medium flottierenden, apoptotischen Zellen an der Zellgesamtzahl.

In Caco-2 Zellen erhöhte die Inkubation mit Acetylsalicylsäure (1mM) nach 72h den Anteil an apoptotischen Zellen signifikant im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.02$). Die Inkubation mit Acetylsalicylsäure (3mM) resultierte nach 48h in einem Anstieg der apoptotischen Zellfraktion auf 1,0-1,4% ($p=0.006$) mit weiterer Zunahme nach 72h Inkubation auf 1,6-2,0% ($p=0.002$) im Vergleich zur

Kontrolle mit 0,4-0,6% bzw. 0,1-0,3% apoptotischen Zellen. Der Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Konzentrationen war nach 48h ($p=0.004$) und 72h Inkubation signifikant ($p=0.002$).

Bei Koinkubation mit Acetylsalicylsäure und Butyrat wurde die Apoptoseinduktion, d. h. die Anzahl vom Zellkulturrasen abgelöster Karzinomzellen, in beiden Zelllinien über den Effekt der Einzelsubstanzen verstärkt.

In HT-29 Zellen zeigt sich unter Inkubation mit einer Kombination von Acetylsalicylsäure (2mM) und Butyrat (2mM) ein Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen nach 48h Inkubation auf das rund 10-fache der Summe der apoptotischen Zellfraktionen der Einzelsubstanzinkubationen. Nach 72h Inkubation waren in der Acetylsalicylsäureinkubation 1,15% (1,0-1,8%), in der Butyratinkubation 1,2% (1,2-1,5%) der Zellen vom Zellverband abgelöst. In der Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination waren nach 72h Inkubation 18,05% (12,3-19,9%) der Gesamtzellzahl in Apoptose gegangen (s. Abb. 10).

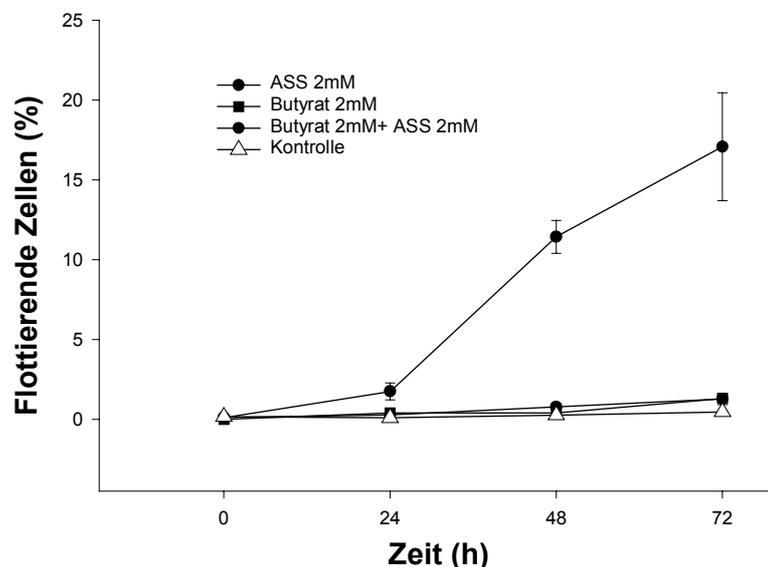


Abb. 10. Apoptoseinduktion durch Inkubation mit einer Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination in HT-29 Zellen.

Inkubation von HT-29 Zellen mit der Kombination Butyrat 2mM+Acetylsalicylsäure 1mM zeigte vergleichbare potenzierende Effekte auf die Apoptoseinduktion.

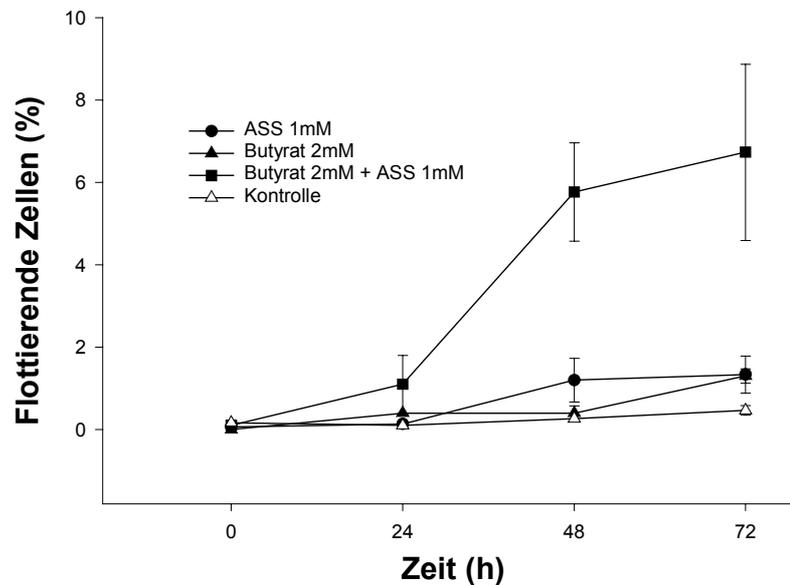


Abb. 11. Apoptoseinduktion durch Inkubation mit einer Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination in HT-29 Zellen. Dargestellt ist der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl.

Hierbei zeigte die Kombination einen ca. dreifach größeren Anteil an flottierenden Zellen, als die Summe der Effekte der Einzelsubstanzen nach 48h, bzw. 72h Inkubation. Butyrat 1mM+Acetylsalicylsäure 1mM resultierte in keiner signifikanten Zunahme der flottierenden Zellen im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. Acetylsalicylsäure (3mM) in Kombination mit Butyrat (1mM) zeigte nach 48h Inkubation einen signifikant verstärkten Effekt im Vergleich zu Acetylsalicylsäure oder Butyrat alleine. Im Vergleich zu Acetylsalicylsäure alleine konnte allerdings nach 72h Inkubation kein Unterschied beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei Inkubation von Caco-2 Zellen mit einer Kombination von Butyrat (2mM) und Acetylsalicylsäure (2mM) beobachteten wir einen, im Vergleich zur Summe der Einzelsubstanzen, etwa verdoppelten Anteil an apoptotischen Zellen. Nach 72h

Inkubation konnte ein größerer Anteil an flottierenden Zellen bei Inkubation mit der Kombination als bei beiden Einzelsubstanzen zusammen beobachtet werden (s. Abb. 12).

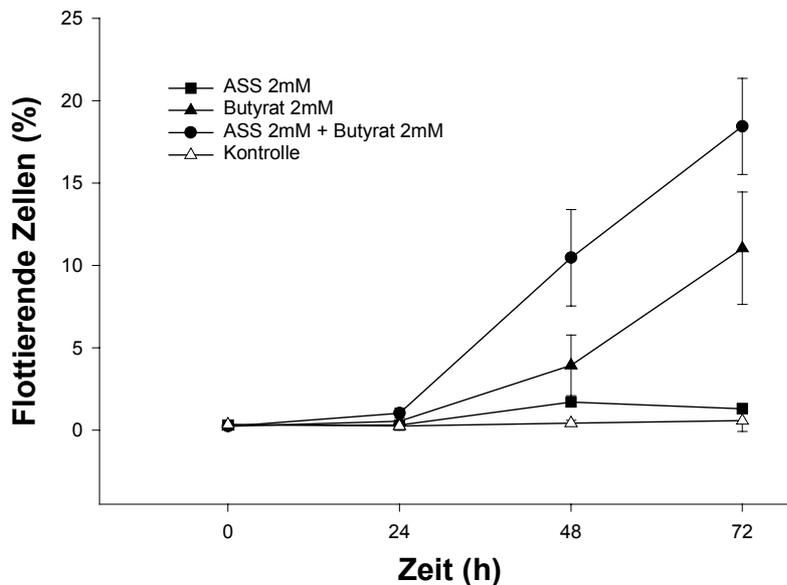


Abb. 12. Apoptoseinduktion durch Inkubation mit einer Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination in Caco-2 Zellen. Dargestellt ist der Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl.

Zwischen dem Effekt einer Inkubation mit Butyrat (2mM) bzw. Butyrat (3mM) oder der Kombination Butyrat 2mM+Acetylsalicylsäure 1mM bzw. Butyrat 3mM+Acetylsalicylsäure 1mM konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Der Anteil an Trypan-positiven (=nicht-vitalen) Zellen an der adhärenz proliferierenden Zellfraktion in beiden Zelllinien änderte sich unter Butyrat- und Acetylsalicylsäureinkubation nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Einzig Butyrat in einer Konzentration von 8mM zeigte nach 72h einen leichten Anstieg auf einen Anteil von 3,9% (3,2-4,3%) Trypan-positiver Zellen in der adhärenz Zellpopulation im Vergleich zur Kontrolle (0,2% (0,0-1,4%)) (p=0.001). Bei

Inkubation mit der Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination konnten ebenfalls keine Unterschiede im Anteil der Trypan gefärbten Zellen an den adhären proliferierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

Der Anteil der Trypan-positiven Zellen an der Gesamtzahl im Medium schwimmender Zellen betrug zwischen 25-100% in allen Inkubationsversuchen und war damit signifikant höher als der Anteil an Trypan-gefärbter Zellen an den adhären proliferierenden Zellen. In der flottierenden Zellpopulation konnte keine konzentrations- oder zeitabhängiger Veränderung, oder ein Unterschied zwischen Butyrat und Acetylsalicylsäureinkubation im Hinblick auf die Anfärbbarkeit der Zellen mit Trypan-Blau festgestellt werden.

3.1.2. PCNA

Um die in den Zellkulturexperimenten gemachten Beobachtungen zu untermauern untersuchten wir die Expression des Proliferationsmarkers PCNA (proliferating cellular nuclear antigen) in der adhären proliferierenden Zellfraktion. Butyrat und Acetylsalicylsäure verringerten im Western Blot Experiment konzentrationsabhängig nach 24h Inkubation die PCNA-Expression in HT-29 Zellen. Gleiche Ergebnisse konnten in Caco-2-Zellen beobachtet werden. Butyrat zeigte in beiden Zelllinien einen deutlicheren Effekt als Acetylsalicylsäure. Die Kombination von Butyrat und Acetylsalicylsäure resultierte in einem deutlich verstärkten Abfall der PCNA-Expression nach 24h und noch deutlicher nach 48 bzw. 72h (Abb. 13). Dies konnte sowohl in HT-29 Zellen, als auch in Caco-2 Zellen beobachtet werden (Abb. 14).

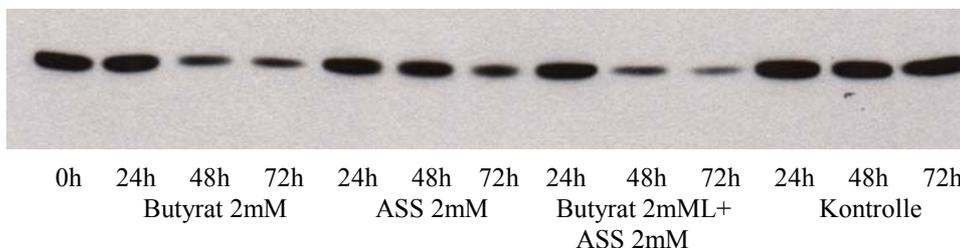


Abb. 13. Western Blot von PCNA (37kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure, sowie der Kombination.

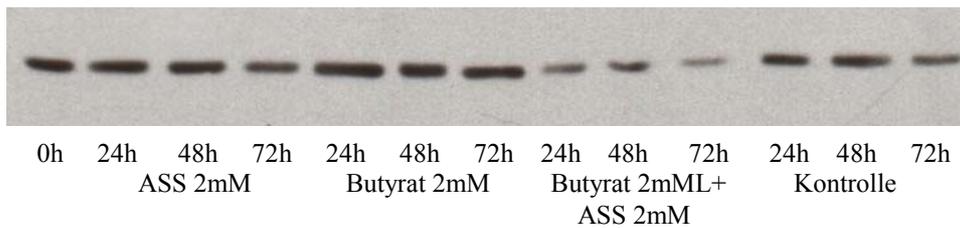


Abb. 14. Western Blot von PCNA (37kD) in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS), sowie der Kombination.

3.2 Einfluss von Butyrat und Acetylsalicylsäure auf die Zelldifferenzierung von Kolonkarzinomzellen

3.2.1. Carcinoembryonales Antigen

In HT-29 Kolonkarzinomzellen induzierte Butyrat (1mM) nach 144h Inkubation die Expression des carcinoembryonalen Antigens im Kulturmedium (Abb. 15). Zu diesem Zeitpunkt wurden in den Versuchsansätzen mit Butyrat im Vergleich zur Acetylsalicylsäureinkubation und zur Mediumkontrolle ungefähr doppelt so hohe CEA-Spiegel gemessen (gemessene Werte (Median): But 1mM: 3,7ng/ml; But 1mM+ASS 1mM: 4ng/ml; ASS 1mM: 1,9ng/ml; Mediumkontrolle: 1,8ng/ml). Der gemessene Anstieg der CEA-Konzentration war ab 144h Inkubation signifikant in den Butyratversuchen höher (But 1mM: $p=0.004$; But 1mM+ASS 1mM: $p=0.001$). Nach weiterem Anstieg nach 192h Inkubation (gemessene Werte (Median): But 1mM: 12,9ng/ml; But 1mM+ASS 1mM: 10,1ng/ml; ASS 1mM: 4ng/ml; Mediumkontrolle: 2,9ng/ml) erreichte die CEA-Konzentration im Medium am Versuchsende (264h) ihren Höhepunkt (gemessene Werte (Median): But 1mM: 50,6ng/ml; But 1mM+ASS 1mM: 53,2ng/ml; ASS 1mM: 15,7ng/ml; Mediumkontrolle: 9,3ng/ml). Acetylsalicylsäureinkubation (1mM) resultierte bei Inkubation für 264h in einem, im Vergleich zum Medium signifikant höheren ($p=0.008$), jedoch im Vergleich zum Butyrat signifikant ($p=0.00008$) niedrigeren CEA-Gehalt im Medium. Coinkubation von HT-29 Zellen mit Acetylsalicylsäure (1mM) mit Butyrat (1mM) wies keinen signifikanten Unterschied zur Inkubation mit Butyrat allein auf (Abb. 15).

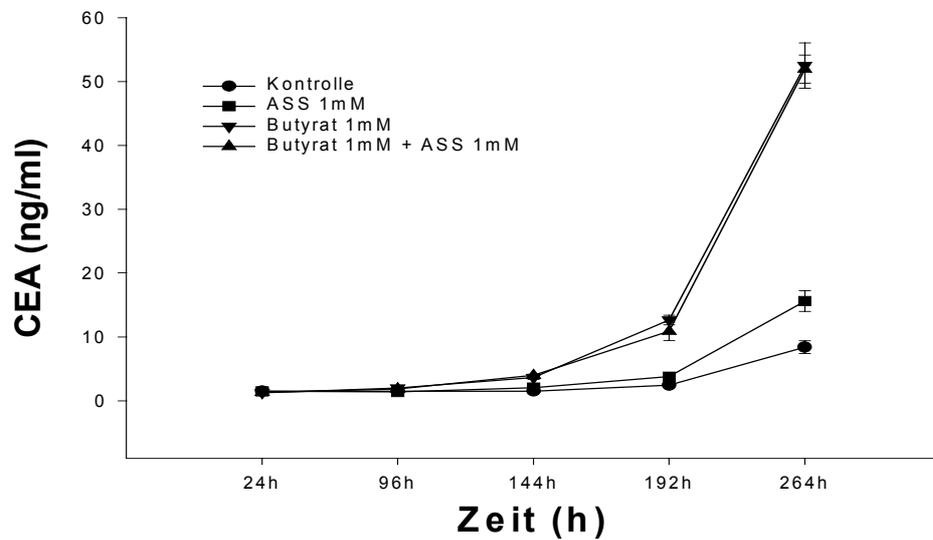


Abb. 15. Induktion des carcinoembryonalen Antigens durch Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS) und der Kombination in HT-29 Zellen.

In Caco-2-Zellen induzierte weder Butyrat noch Acetylsalicylsäure die Expression von CEA im Zellkulturmedium. Die Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination blieb ebenso ohne Effekt auf den CEA-Gehalt im Medium der Caco-2-Zellen (Daten nicht dargestellt).

3.3 Modulation von Faktoren der Apoptosekontrolle durch Butyrat und Acetylsalicylsäure

Um die in den Inkubationsexperimenten beobachtete Induktion von Apoptose in den untersuchten Kolonkarzinomzellen näher zu charakterisieren, untersuchten wir die Expression von Faktoren der Apoptoseregulation im Western Blot.

3.3.1. Bcl-X_L

Die Bcl-2 Proteinfamilie umfasst pro- und anti-apoptotisch wirkende Faktoren. Bcl-X_L, als Mitglied dieser Proteinfamilie, stellt einen anti-apoptotisch wirkenden Faktor dar. Butyratinkubation resultierte in einer Abnahme der Bcl-X_L-Expression in HT-29 Adenokarzinomzellen. Dieser Effekt war bei Konzentrationen ab 1mM für 24h sichtbar, wobei es bei niedrigen Konzentrationen (Butyrat 1-2mM) nach 48h wieder zu einem Anstieg von Bcl-X_L kam. Dieser Wiederanstieg wurde bei höheren Butyratkonzentrationen nicht mehr so deutlich beobachtet (Abb. 16).

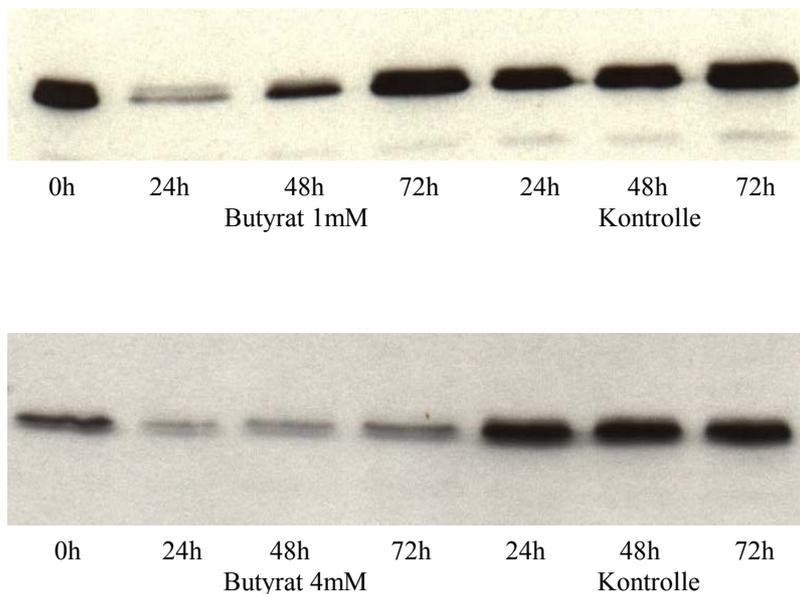


Abb. 16. Western Blots von Bcl-X_L (26kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat und der Kontrolle.

In Caco-2 Zellen kam es ebenso zu einem Abfall des Bcl-X_L-Proteingehaltes unter Butyratinkubation, mit deutlichen Effekten ab Butyrat (3mM) (Abb. 17). Acetylsalicylsäure hatte keinen Einfluss auf die Bcl-X_L-Expression in HT-29 und Caco-2 Zellen und die Kombination Acetylsalicylsäure+Butyrat ergab gleiche Ergebnisse wie Butyrat allein.

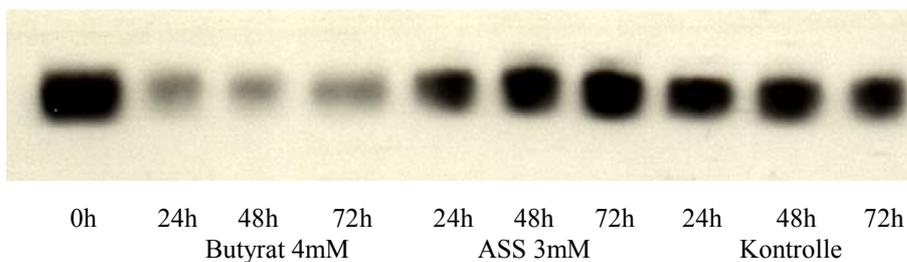


Abb. 17. Western Blot von Bcl-X_L (26kD) in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS) und der Kontrolle.

3.3.2. Bak

Im Gegensatz zu Bcl-X_L ist Bak ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie. Butyrat ($\geq 2\text{mM}$) induzierte in HT-29-Zellen die Expression von Bak, was auch in Caco-2-Kolonkarzinomzellen (\geq Butyrat 2mM) beobachtet werden konnte. Dieser Effekt war zeitabhängig und die grösste Steigerung wurde nach 72h Inkubation beobachtet. Acetylsalicylsäureinkubation hatte keinen Einfluss auf die Bak-Expression weder in HT-29 (Abb. 18). Die Kombination beider Substanzen spiegelte die Effekte des Butyrats wider. Ähnliche Ergebnisse konnten mit Caco-2-Zellen beobachtet werden (Abb. 19).

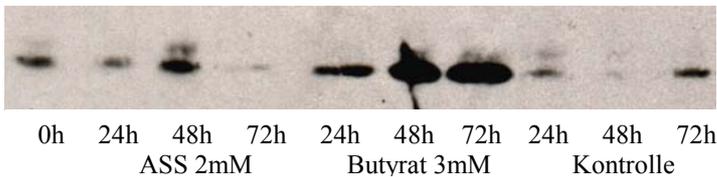
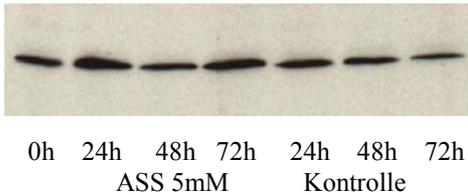
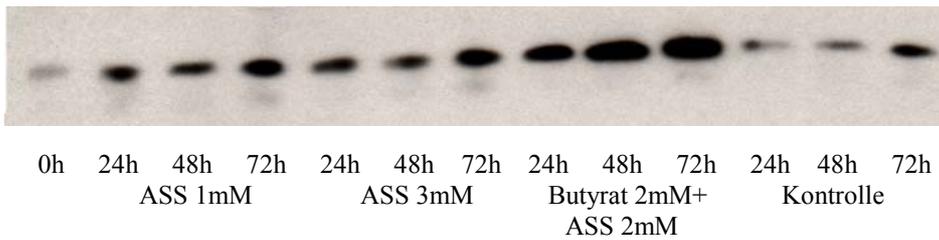


Abb. 18. Western Blots von HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS), einer Kombination, sowie der Kontrolle mit einem spezifischen Antikörper gegen Bak (23kD).

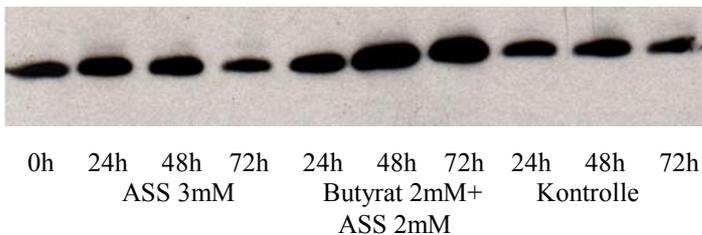


Abb. 19. Western Blot von Bak (23kD) in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Acetylsalicylsäure (ASS) und einer Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination, sowie der Kontrolle.

3.3.3. p53

p53 greift über die Induktion von Bax, einem pro-apoptotischen Faktor, in die Apoptoseregulation ein. In vielen Kolonkarzinomzellen liegt ein mutiertes p53 und damit eine Störung in der Apoptoseregulation vor. Der von uns verwendete Antikörper bindet sowohl an p53 als auch an mutiertes p53. In HT-29 Zellen

bewirkte Butyratinkubation in einer Konzentration $\geq 2\text{mM}$ einen zeitabhängigen Abfall des Proteingehaltes an mutiertem p53. Acetylsalicylsäure hatte keinen Einfluss auf die p53 Expression. Die Kombination Acetylsalicylsäure-Butyrat zeigte die gleichen Effekte wie die alleinige Butyratinkubation (s. Abb. 20).

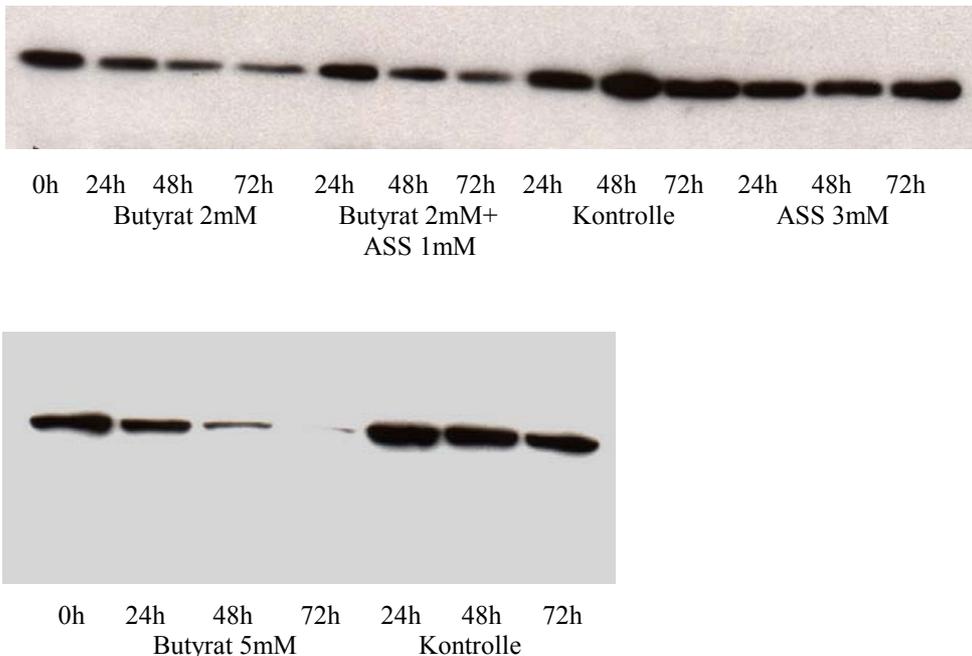


Abb. 20. Western Blots von p53 (53kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS), sowie der Kombination.

In Caco-2-Kolonkarzinomzellen konnte mit dem verwendeten Antikörper kein p53-Protein nachgewiesen werden.

3.3.4. 14-3-3 ϵ

Ein weiteres anti-apoptotisches Protein ist 14-3-3 ϵ . 14-3-3 ϵ ist an der Phosphorylierung und damit Inaktivierung pro-apoptotischer Bcl-2-Faktoren beteiligt. Weder die Butyrat-, noch die Acetylsalicylsäureinkubation veränderten die Expression des 14-3-3 ϵ -Proteins in HT-29 und Caco-2 Zellen. Ebenso wenig hatten die Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombinationen einen Effekt auf die 14-3-3 ϵ -Expression (Abb. 21, 22).

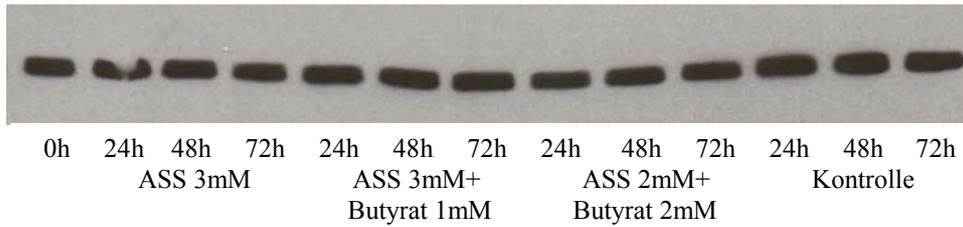


Abb. 21. Western Blot von 14-3-3 ϵ (29kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Acetylsalicylsäure, sowie mit der Kombination.

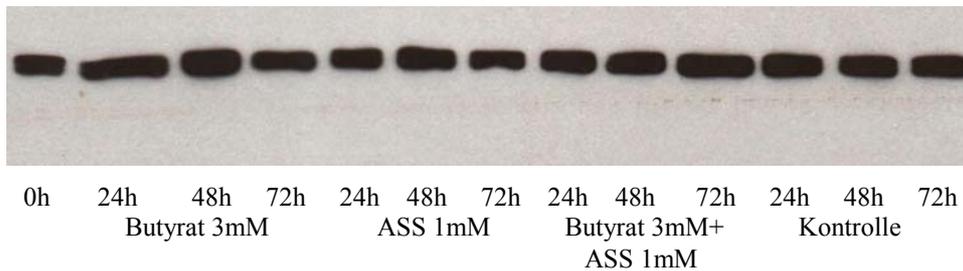


Abb. 22. Western Blot von 14-3-3 ϵ (29kD) in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS), sowie der Kombination.

3.3.5. Mcl-1

Mcl-1 ist ein anti-apoptotisches Bcl-2-Familienmitglied. Das Mcl-1-Protein wurde weder in HT-29 noch in Caco-2-Zellen mit dem von uns verwendeten Antikörper detektiert (keine Abbildung).

Tabelle II zeigt einen Überblick über die Veränderungen der Expression der untersuchten Faktoren während Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure und der Kombination.

HT-29 / Caco-2	Butyrat	Acetylsalicyl -säure	Butyrat + Acetylsalicylsäure
PCNA	↓ / ↓	↓ / ↓	↓↓↓ / ↓↓↓
Bcl-X_L	↓ / ↓	→ / →	↓ / ↓
Bak	↑ / ↑	→ / →	↑ / ↑
p53	↓ / -	→ / -	↓ / -
14-3-3ε	→ / →	→ / →	→ / →

Tabelle II. Ergebnisübersicht Western Blot: Zellproliferation und Apoptosekontrolle. Butyrat und Acetylsalicylsäure zeigen in Kombination einen verstärkten Effekt auf die Expression von PCNA in HT-29 und Caco-2 Kolonkarzinomzellen (↑: Zunahme der Expression; →: unveränderte Expression; ↓: Abnahme der Expression; ; ↓↓: starke Abnahme der Expression).

3.4 Modulation von Faktoren der Zellzykluskontrolle durch Butyrat und Acetylsalicylsäure

3.4.1. cdk2

Die cyclin-abhängige Kinase 2 (cdk2) ist mit ihren Bindungspartnern Cyclin A bzw. E an der Regulation des Restriktionspunktes und damit am Übergang der Zelle von der G₁-Phase in die S-Phase beteiligt. Butyratinkubation ($\geq 6\text{mM}$) verminderte die Expression des cdk2-Proteins in HT-29 Zellen. Bei niedrigeren Butyratkonzentrationen ($\leq 5\text{mM}$) wurde kein Effekt auf die cdk2-Proteinkonzentration beobachtet. Acetylsalicylsäure (3mM) resultierte in einer schwachen Verminderung der Konzentration von cdk2 nach 72h Inkubation, Acetylsalicylsäure (5mM) senkte den cdk2-Gehalt der HT-29-Zellen deutlich (s. Abb. 23).

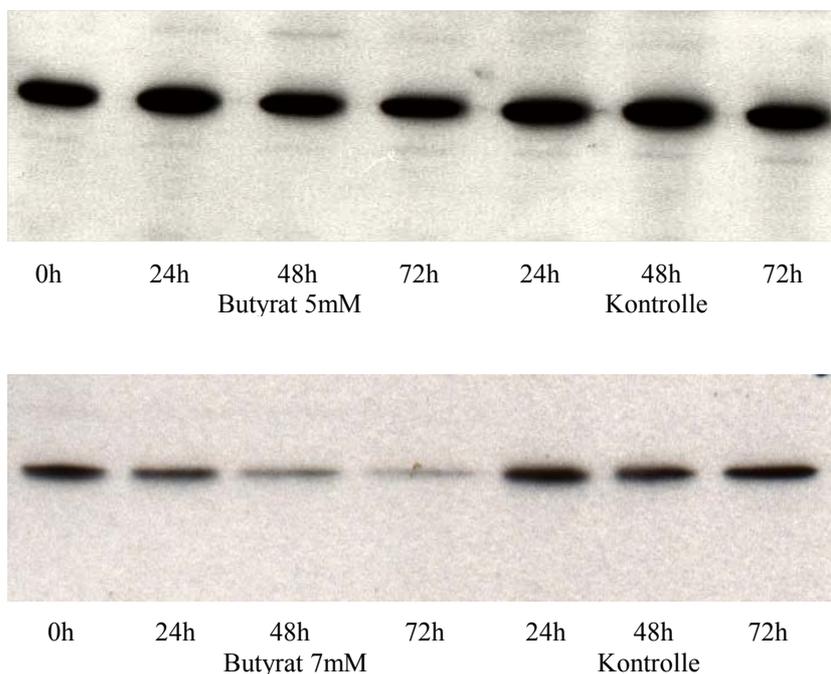


Abb. 23. Western Blot von cdk2 (33kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat.

Die Inkubation mit den Kombinationen Butyrat 3mM+Acetylsalicylsäure 1mM, Butyrat 2mM+Acetylsalicylsäure 2mM sowie Butyrat 1mM+Acetylsalicylsäure 3mM reduzierten die cdk2-Expression nach 24h bzw. 48h Inkubation deutlich.

Butyrat 2mM+Acetylsalicylsäure 1mM resultierte in einer schwächeren cdk2-Abnahme (s. Abb. 24).

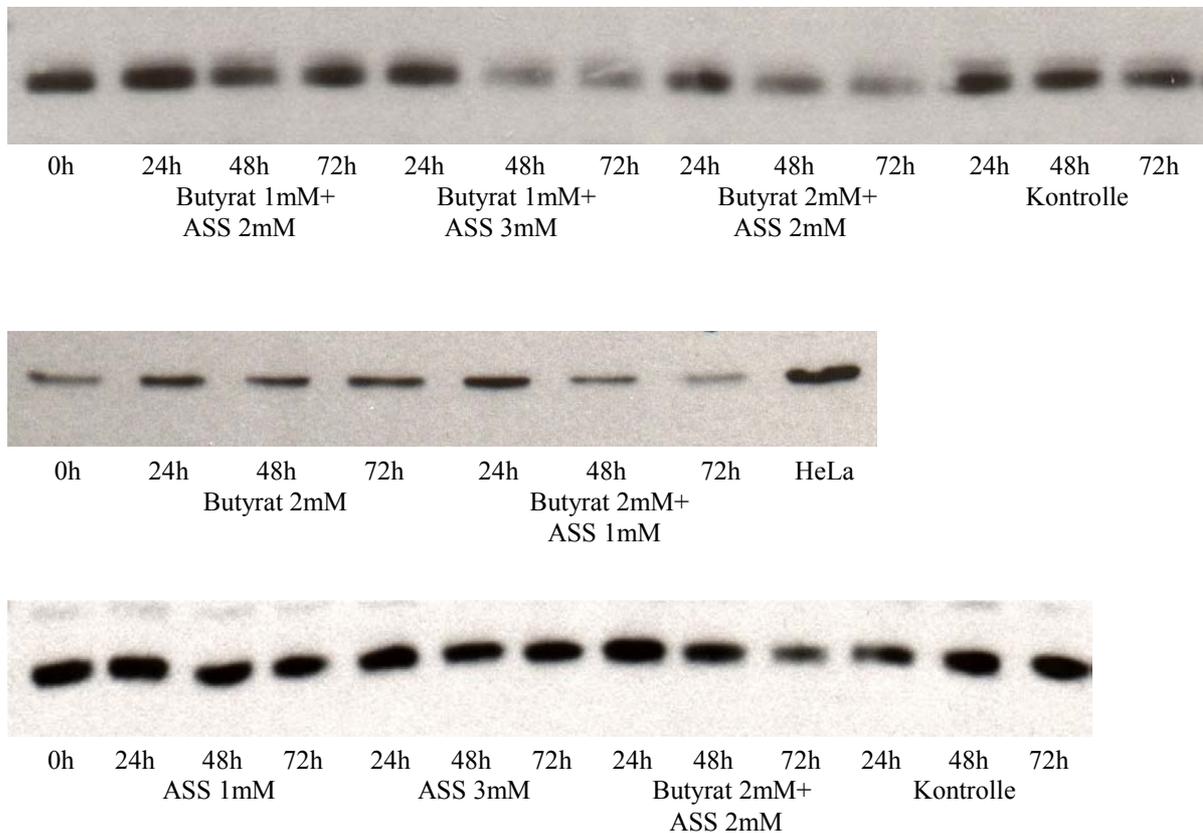


Abb.24 . Western Blots von cdk2 (33kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS), sowie der Kombination Acetylsalicylsäure mit Butyrat.

In Caco-2-Zellen hatte weder Butyrat ($\leq 4\text{mM}$), noch Acetylsalicylsäure ($\leq 3\text{mM}$) einen Effekt auf die cdk2-Expression. Die Kombination aus Acetylsalicylsäure und Butyrat wies ebensowenig einen Effekt auf (Abb. 25).

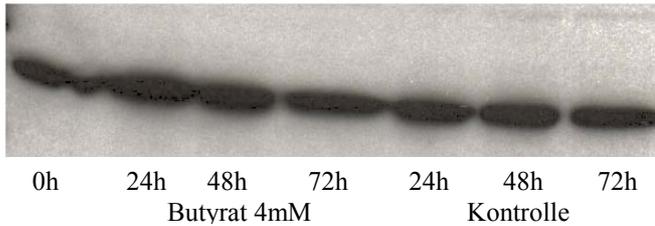
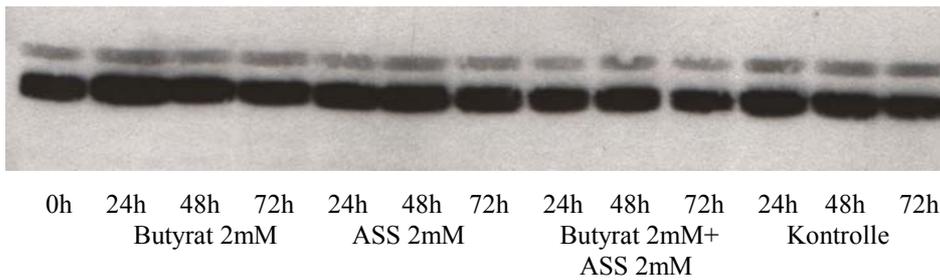


Abb. 25. Western Blots von cdk2 (33kD) in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS), der Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination, sowie der Kontrolle.

3.4.2. Cyclin D₃

Cyclin D₃ ist der Interaktionspartner von cdk4. Der Cyclin D₃-cdk4-Komplex ist an der Phosphorylierung des Retinoblastomproteins und damit an der Kontrolle des Restriktionspunktes beteiligt. Butyrat ($\geq 2\text{mM}$) induzierte in HT-29 Zellen, sowie in Caco-2-Zellen die Expression von Cyclin D₃. Der grösste Effekt wurde dabei konzentrationsunabhängig nach 24h beobachtet, mit anschliessender Abnahme nach 48h bzw. 72h (Abb. 26, 27). Acetylsalicylsäure hatte keinen Einfluss auf das Cyclin D₃-Protein und die Kombination aus Butyrat und Acetylsalicylsäure zeigte die gleichen Effekte wie Butyrat allein.

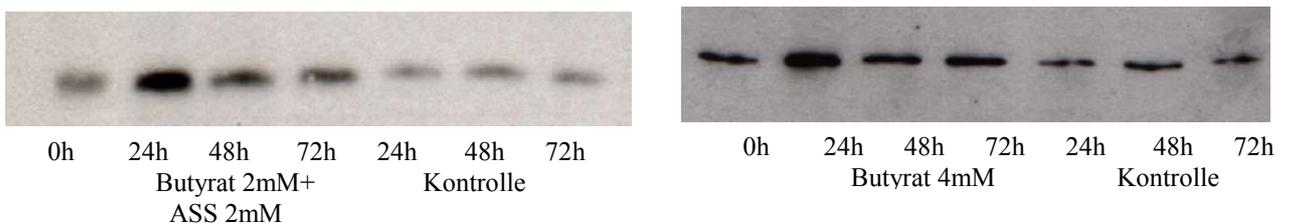


Abb. 26. Western Blots von Cyclin D₃ (33kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat und einer Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombination.

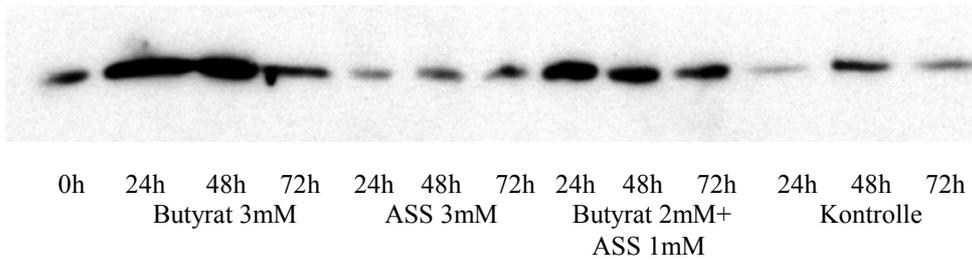


Abb. 27. Western Blot von Cyclin D₃ (33kD) in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS) und einer Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination.

3.4.3. p21^{Waf1/Cip1}

Neben der Apoptoseregulation ist das p53-Protein über die Regulation der Expression des p21^{Waf1/Cip1}-Proteins an der Zellzykluskontrolle beteiligt. p21^{Waf1/Cip1} blockiert cyclin-abhängige Kinasen und hierdurch den Zellzyklus in der G₁-Phase. In HT-29 und Caco-2-Zellen wurde unter Butyratinkubation die Expression des p21^{Waf1/Cip1}-Proteins induziert. Konzentrationsunabhängig zeigte sich hierbei der grösste Effekt nach 24h Inkubation, mit anschliessendem Abfall des p21^{Waf1/Cip1}-Proteingehalts bei 48h- bzw. 72h-Inkubation (Abb. 28).

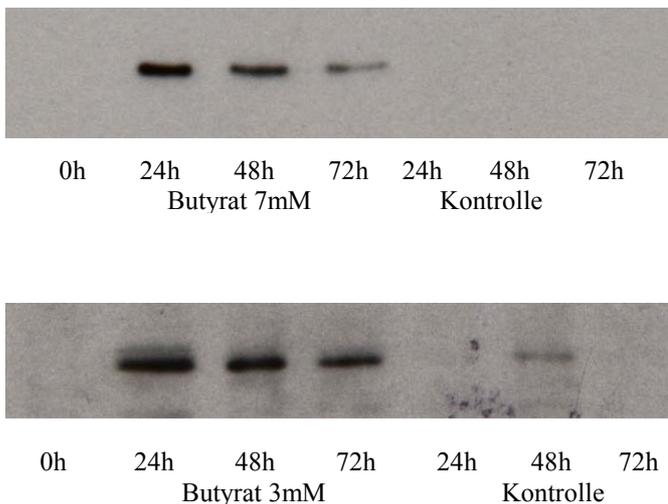


Abb. 28. Western-Blot von p21^{Waf1/Cip1} (21kD) in HT-29 Zellen (oben), sowie Caco-2 Zellen (unten) nach Inkubation mit Butyrat und der Kontrolle.

Butyrat (2mM) war dabei die niedrigste Konzentration, welche einen deutlichen Anstieg des p21-Proteins in HT-29 und Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation bewirken konnte.

Acetylsalicylsäure ($\leq 3\text{mM}$) hatte keinen Einfluss auf die p21^{Waf1/Cip1}-Proteinexpression in Caco-2 und HT-29 Kolonkarzinomzellen. In HT-29 Zellen induzierte Acetylsalicylsäure (5mM) die Expression von p21 nach 24h, mit einem weiteren Anstieg nach 48h und darauffolgendem Abfall (s. Abb. 29).

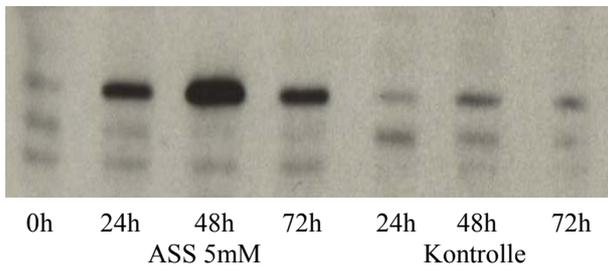


Abb. 29. Western-Blot von p21^{Waf1/Cip1} (21kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Acetylsalicylsäure (ASS) und der Kontrolle.

Die Kombinationen ASS 3mM+Butyrat 1mM, ASS 2mM+Butyrat 1mM sowie ASS 1mM+Butyrat 1mM führten in HT-29 Zellen zu einem Anstieg der p21^{Waf1/Cip1}-Expression nach 24h Inkubation mit darauffolgendem Abfall, wohingegen Butyrat (1mM) in einer nur schwachen Induktion von p21 resultierte und Acetylsalicylsäure ($\leq 3\text{mM}$) für sich alleine ohne Effekt blieben. Unter Inkubation mit den Kontrolllösungen konnte keine Veränderung der p21-Expression beobachtet werden (Abb. 30).

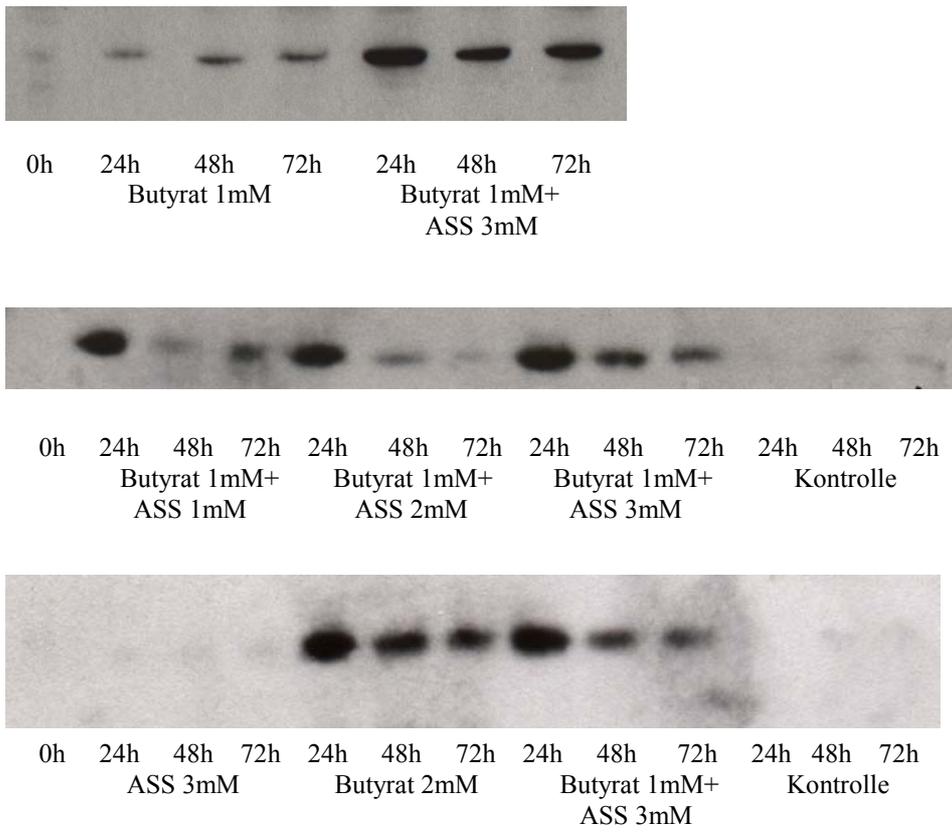


Abb. 30. Western-Blots von p21^{Waf1/Cip1} (21kD) in HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure, der Kombination und der Kontrolle.

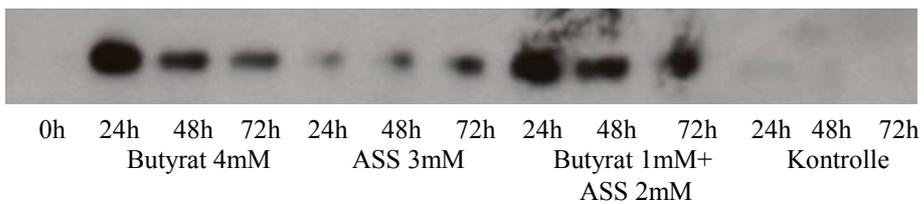


Abb. 31. Western-Blot von p21 (21kD) in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure (ASS), der Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination und der Kontrolle.

3.4.4. p16

Weder in HT-29 noch in Caco-2-Zellen wurde das p16-Protein mit dem verwendeten Primärantikörper nachgewiesen. Es wurde weder durch Acetylsalicylsäure, Butyrat oder die Kombination induziert (keine Abbildung).

Tabelle III zeigt eine Zusammenfassung der Veränderungen der Expression der untersuchten Faktoren im Western Blot.

HT-29 / Caco-2	Butyrat	Acetylsalicyl-säure	Butyrat + Acetylsalicylsäure
cdk2	→ / →	(→) / →	↓ / →
Cyclin D3	↑ / ↑	→ / →	↑ / ↑
p21^{Waf1/Cip1}	↑ / ↑	(↑) / →	↑↑ / ↑

Tabelle III. Ergebnisübersicht Western Blot: Zellzykluskontrolle. Butyrat und Acetylsalicylsäure zeigen in Kombination einen verstärkten Effekt auf die Expression von p21^{Waf1/Cip1} und cdk2 in HT-29 Kolonkarzinomzellen (↑: Zunahme der Expression; →: unveränderte Expression; ↓: Abnahme der Expression; ↑↑: starke Zunahme der Expression).

Zusammenfassend ließ sich ein verstärkter Effekt auf die Expression der zellzyklusregulierenden Faktoren cdk2 und p21^{Waf1/Cip1} durch die Koinkubation von Butyrat und Acetylsalicylsäure im Vergleich zu den Einzelsubstanzen beobachten.

3.5 Effekt von Butyrat auf die NF κ B-Signaltransduktionskaskade

Die NF κ B-Signaltransduktionskaskade ist an der Apoptoseregulation beteiligt. Eine Aktivierung von NF κ B führt zu einer Inhibition der Apoptose. TNF- α aktiviert die NF κ B-Signaltransduktionskaskade. Wir untersuchten den Einfluss von Butyrat auf die TNF- α -aktivierte NF κ B-Kaskade anhand der Expressionsveränderung eines NF κ B-Inhibitors, des I κ B- α -Proteins.

Ohne Vorbehandlung mit Butyrat folgte der TNF- α -Stimulation ein unmittelbarer Anstieg von phosphoryliertem I κ B- α in HeLa-Zellen, während eine Vorinkubation mit Butyrat (5mM) nur zu einer geringen Zunahme von phospho-I κ B- α führte (Abb. 32). Die Menge an I κ B- α -Protein nahm nach TNF- α -Stimulation bei unbehandelten Zellen rasch ab (nach 2 –5min). Im Gegensatz dazu konnte bei butyratbehandelten Zellen nach TNF- α -Gabe eine deutlich geringere Degradation von I κ B- α beobachtet werden (Abb. 33).

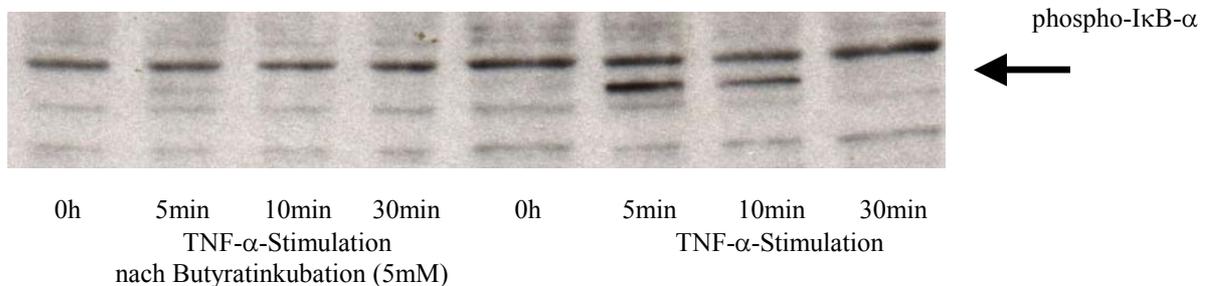


Abb. 32. Veränderung des Phosphorylierungsgrades von I κ B- α (40kD) in HeLa Zellen bei Stimulation mit TNF- α und bei Stimulation nach Butyratinkubation.

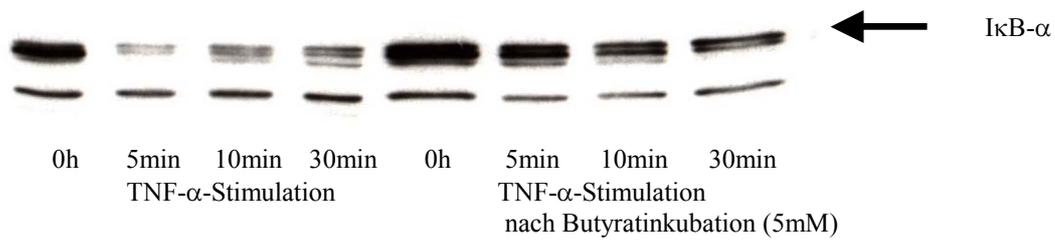


Abb. 33. Veränderung der Expression von I κ B- α (40kD) in HeLa Zellen bei Stimulation mit TNF- α und vorheriger Butyratinkubation.

Die Inhibition der Phosphorylierung und die verringerte Degradation des Inhibitors I κ B- α sind indirekte Merkmale einer Translokationshemmung von NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern nach TNF- α -Stimulation butyratbehandelter Zellen. Diese Beobachtung konnte durch immunhistochemische Färbungen bestätigt werden (Lührs, Schaubert et al. 1999).

4 Diskussion

Butyrat und Acetylsalicylsäure inhibieren die Proliferation und induzieren Differenzierung sowie Apoptose bei humanen kolorektalen Karzinomzellen. Weder die genauen Mechanismen der Wirkung der Einzelsubstanzen, Butyrat und Acetylsalicylsäure, noch deren gemeinsamer Effekt bei gleichzeitiger Applikation auf das Wachstum und Differenzierungsmuster von humanen kolorektalen Karzinomzellen sind bekannt. In den Zellkulturexperimenten, sowie in den unten diskutierten Western Blot Untersuchungen, konnten wir die Ergebnisse zahlreicher Arbeitsgruppen bestätigen und erweitern. Ziel der vorliegenden Dissertation war darüberhinaus die Charakterisierung potentieller Wirkungsverstärkungen bei Inkubation der Zellen mit einer Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination.

Erstmals konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass sich die Wirkungen von Butyrat und Acetylsalicylsäure in Kombination über die Summe der Einzelwirkungen hinaus verstärken: Ein deutlich verstärkter Effekt konnte auf die Zellproliferation und Apoptoseinduktion von HT-29 und Caco-2 Zellen beobachtet werden. In Kombination beeinflussen die beiden Wirkstoffe die Proteinspiegel von cdk2 und p21^{Waf1/Cip1} schon bei niedrigen Konzentrationen. In höherer Dosierung verändern Butyrat und Acetylsalicylsäure die Expression wichtiger zellzyklusregulierender Proteine. Butyrat vermittelt zumindest einen Teil seiner pro-apoptotische Wirkung über eine Induktion von Bak und eine Expressionsverminderung von Bcl-X_L. Gleichzeitig induziert Butyrat die Differenzierung in HT-29 Zellen, wobei die Koinkubation mit Acetylsalicylsäure keine Wirkungsverstärkung zeigte.

Proliferation, Differenzierung und Apoptose

Unter Inkubation von HT-29 und Caco-2 Kolonkarzinomzellen mit Butyrat kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Proliferationshemmung im Vergleich zur Inkubation mit einer Kontrollösung (Barnard and Warwick 1993; Basson, Turowski et al. 1996). Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der Expression des Enzyms Alkalische Phosphatase und des carcinoembryonalen

Antigens, zwei etablierten Differenzierungsmarkern, in beiden Zelllinien und morphologischen Veränderungen der Zellen gleichbedeutend mit einem differenzierteren Phänotyp (Gamet, Daviaud et al. 1992; Basson, Turowski et al. 1996). Neben der Expression des Enzyms Alkalische Phosphatase gilt die Exkretion des carcinoembryonalen Antigens als Index für die Differenzierung von kolorektalen Karzinomzellen (Sarraf, Mueller et al. 1998; Boxberger, Richter et al. 1999). In unseren Experimenten konnten wir bei Inkubation mit Butyrat einen Anstieg von CEA im Zellkulturmedium von HT-29 Zellen feststellen. In Caco-2 Zellen dagegen war kein Anstieg des carcinomembryonalen Antigens über den von uns gewählten Zeitraum zu beobachten. Die Erklärung hierfür könnte sein, dass wir in unseren Experimenten eine niedrigere Butyratkonzentration wählten, als in jenen Studien, die eine Differenzierung von Caco-2 Zellen unter Butyratexposition beschreiben (Litvak, Evers et al. 1998). Die im Kolonlumen vorliegenden Butyratkonzentrationen schwanken zwischen 13 und 19mmol/L (Cummings 1981). Die von uns verwendeten Butyratkonzentrationen lagen zwischen 1 bis maximal 8mmol/L und damit unterhalb der physiologischen Spiegel. Dennoch kann in Kolonkarzinomzelllinien durch z.B. das Fehlen einer, *in vivo* vorliegenden, luminalen Mukusschicht, mit einer verstärkten Butyratwirkung gerechnet werden (Hague, Singh et al. 1997). Um eine toxische Wirkung der getesteten Substanzen auf die Zellen zu vermeiden, beschränkten wir den Inkubationszeitraum in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen auf maximal 72h (Hague, Diaz et al. 1997; Castano, Dalmau et al. 1999).

Butyrat löst ebenso bei Kolonadenom-, wie bei Kolonkarzinomzelllinien Apoptose aus und ist von den im Kolonlumen hauptsächlich vorkommenden SCFAs jene mit der stärksten pro-apoptotischen Wirkung (Hague, Elder et al. 1995). Um die Auslösung von Apoptose in unserem Zellkulturmodell zu quantifizieren, verwendeten wir ein Verfahren, welches von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen verwendet wird: Zellen, die adhären in Zellkulturflaschen wachsen, schilfern in das Zellkulturmedium ab, sobald sie in Apoptose gehen (Heerdt, Houston et al. 1994). Die Zählung der Zellzahl im Zellkulturüberstand

gilt als etablierte Methode der Bestimmung der Apoptoseinduktion von kurzkettigen Fettsäuren und NSAID, wie Acetylsalicylsäure (Hague, Elder et al. 1995; Hague and Paraskeva 1995; Elder, Hague et al. 1996; Hague, Diaz et al. 1997; Bonnotte, Favre et al. 1998; Castano, Dalmau et al. 1999). Mittels eines AnnexinV Assays konnte zudem in unserem Labor gezeigt werden, dass es sich bei den flottierenden Zellen um apoptotische Zellen handelt (Kudlich, 2001). Basson et al. konnten unter Butyratinkubation von Caco-2 Zellen eine Abnahme von Zelladhäsionsmolekülen beobachten, was ein weiteres Indiz in diesem Zusammenhang darstellt (Basson, Turowski et al. 1996).

Weiterhin konnte in unseren Experimenten ein, im Vergleich zur adhärennten Zellpopulation, signifikant erhöhter Anteil Trypan-positiver Zellen an der im Zellkulturmedium flottierenden Zellfraktion beobachtet werden. Die Größe dieses Anteils änderte sich nicht während der verschiedenen Inkubationsexperimente und war damit unabhängig vom apoptose-induzierenden Substrat.

Die flottierende Zellfraktion im Butyratinkubationsexperiment zeigt eine höhere Aktivität der Alkalischen Phosphatase als die adhärennte Zellfraktion (Heerdt, Houston et al. 1994; Litvak, Evers et al. 1998). Es wird angenommen, dass Kolonkarzinomzellen unter Butyratexposition zunächst differenzieren und dann apoptotisch werden (Heerdt, Houston et al. 1994).

Acetylsalicylsäure hemmt wie Butyrat die Zellproliferation von Kolonadenomzellen und noch deutlicher von Karzinomzellen. Gleichzeitig induziert Acetylsalicylsäure Apoptose in diesen Zellen (Elder, Hague et al. 1996; Ricchi, Pignata et al. 1997; Castano, Dalmau et al. 1999). Die Konzentrationen, welche in den vorliegenden Untersuchungen Apoptose induzierten, waren niedriger als bei Castaño et al., welche erst bei einer Konzentration von 10mM und 48h Inkubation einen Effekt von Acetylsalicylsäure sahen (Castano, Dalmau et al. 1999). Elder et al. konnten in HT-29 Zellen nach einer 96h Inkubation mit Acetylsalicylsäure (2mM) die Induktion von Apoptose in 50% der Zellen sehen (Elder, Hague et al. 1996). In einer dritten Studie konnte gezeigt werden, dass

Acetylsalicylsäurekonzentrationen ($> 2.5\text{mM}$) keine Apoptose, jedoch Nekrose in HT-29 Zellen auslösen können (Subbegowda and Frommel 1998). Die von uns gewählten Konzentrationen zwischen 1mM und 3mM für maximal 72h lagen demnach im unteren Drittel der von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Acetylsalicylsäurekonzentrationen. Niedrige Konzentrationen wie etwa Acetylsalicylsäure (1mM) konnten in unseren Versuchen nach 48h Inkubation in HT-29 und nach 72h in Caco-2 Apoptose auslösen.

Die durch Acetylsalicylsäure in Kolonkarzinomzellen ausgelöste Apoptose zeigt morphologische Merkmale, welche Qiao et al. dazu veranlassten von einer „atypischen“ Apoptose zu sprechen (Qiao, Hanif et al. 1998). Dennoch gilt auch hierbei das Maß der Zellabschilferung als Index für die Apoptoseauslösung (Elder, Hague et al. 1996; Castano, Dalmau et al. 1999).

Unter Acetylsalicylsäureinkubation kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Differenzierungsmarkers CEA in HT-29 Zellen, aber nicht in Caco-2 Zellen. Acetylsalicylsäure scheint demnach ebenfalls die Zelldifferenzierung in Kolonkarzinomzellen zu fördern, da es in Caco-2 Zellen auch, von uns nicht untersuchte, Differenzierungsmarker induziert (Ricchi, Pignata et al. 1997). Dieser differenzierungsfördernde Effekt ist allerdings im Vergleich zur Wirkung des Butyrats minimal und bei Inkubation in Kombination kann kein Unterschied zur alleinigen Butyratinkubation beobachtet werden.

Bei Koinkubation der Zellen in Butyrat und Acetylsalicylsäure kam es zu einer beträchtlich verstärkten Hemmung der Zellproliferation in beiden getesteten Zelllinien. Beim Vergleich des Wachstums unter Butyrat (bzw. Acetylsalicylsäure) und der Kombination ließ sich eine proliferationshemmende Wirkung der Kombination beobachten, welche deutlicher ausfiel als unter der Einzelinkubation. Dies spiegelte sich ebenso im Verlauf der PCNA-Proteinspiegel wider. Das proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ist ein Kofaktor der DNA-Polymerasen δ und ϵ und essentiell für die DNA Replikation sowie Reparatur in der sich teilenden Zelle (Cayrol, Knibiehler et al. 1998). PCNA ist ein Marker für die Proliferation einer Zelle und die Höhe des PCNA-Spiegels korreliert mit der Proliferationsrate von Karzinomzellen (Shpitz,

Bomstein et al. 1997). Butyrat und Acetylsalicylsäure senkten für sich allein die PCNA-Expression im Vergleich zu den Kontrolllösungen. In Inkubationsexperimenten mit einer Kombination beider Substanzen ließ sich eine weitere Absenkung der PCNA-Niveaus beobachten, was die Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten untermauerte.

Apoptoseregulation

Gleichzeitig mit der verstärkten Abnahme des Zellwachstums während Inkubation mit Butyrat und Acetylsalicylsäure kam es zu einer signifikant über die Summe der Einzelsubstanzen hinausgehenden Auslösung von Apoptose.

Der Ablauf des programmierten Zelltodes wird massgeblich von den Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert (Reed 1997). Diese pro- und anti-apoptischen Faktoren werden vom Kolonepithel exprimiert, wobei in gesunder, normaler Mukosa ein Gradient mit einer Zunahme der pro-apoptischen Fraktion an der Kolonkrypte zu beobachten ist (Moss, Agarwal et al. 1996). In maligne transformierten Kolonzellen ist die Expression von anti-apoptischen Proteinen verstärkt und die pro-apoptischer Proteine abgeschwächt. Dies steht im Einklang mit einer Blockierung des Apoptoseprogramms als wichtigem Schritt in der Kolonkarzinogenese (Bedi, Pasricha et al. 1995; Krajewska, Moss et al. 1996; Moss, Agarwal et al. 1996).

Um den Mechanismus hinter der pro-apoptischen Wirkung der kurzkettigen Fettsäure Butyrat, der Acetylsalicylsäure, sowie der Kombination auf Kolonkarzinomzellen genauer zu studieren, untersuchten wir die Expression verschiedener apoptoseregulierender Proteine. Da der Ablauf der Apoptose in der adhären Zellfraktion initiiert wird, beschränkten wir uns hierbei auf die adhärent wachsenden Zellen (Heerdt, Houston et al. 1994). Unter Butyratinkubation kam es zu einem Abfall des anti-apoptisch wirkenden Proteins Bcl-X_L in HT-29 und Caco-2 Zellen, was die Beobachtungen in einer aktuellen Studie bestätigen konnte (Litvak, Evers et al. 1998). Litvak et al. konnten in Caco-2 Zellen einen Abfall von Bcl-X_L im RNA-Protection-Assay, bei einem gleichfalls abfallendem Bcl-2 RNA-Gehalt und einem ansteigenden pro-apoptischen Bax-Spiegel, beobachten. Die Bak-Expression zeigte sich

unverändert. Dem widersprechen die vorliegenden Daten und die Ergebnisse von Ruemmele et al., die in der gleichen Zelllinie einen Anstieg von Bak beobachten konnten, während die Ausschaltung der Proteinneusynthese in Caco-2 den Anstieg von Bak-Protein und damit die butyrat-induzierte Apoptose verhindern konnten (Ruemmele, Dionne et al. 1999). Die Zugabe eines Proteinsynthesehemmers nach dem Anstieg von Bak konnte den Ablauf der Apoptose nicht mehr stoppen. Moss et al. konnten in der ersten Untersuchung zur Beeinflussung der Bcl-2-Apoptosekontrolle durch Butyrat zeigen, dass Butyrat in HT-29-Zellen ebenfalls die Expression von Bak verstärkt, was Hague et al. in AA/C₁ Adenomzellen bestätigen konnten (Moss, Agarwal et al. 1996; Hague, Diaz et al. 1997). Die gleichzeitige Überexpression von Bcl-2 konnte die Bak-vermittelte Apoptose nicht verhindern (Hague, Diaz et al. 1997). Bak scheint demnach am wahrscheinlichsten der Vermittler der pro-apoptischen Butyratwirkung in maligne entarteten Kolonzellen zu sein. Wir konnten darüberhinaus einen Abfall des anti-apoptischen Bcl-X_L-Proteins beobachten. Tabelle IV fasst die beschriebenen Beobachtungen zur Butyratwirkung auf Caco-2 und HT-29 Zellen zusammen.

Autor	Untersuchte Zelllinie	Bak	Bcl-X _L	Bax	Bcl-2
Moss, Agarwal et al. 1996	HT-29	↑	→	→	↑
Litvak, Evers et al. 1998	Caco-2	→	↓	*	↓
Ruemmele, Dionne et al. 1999	Caco-2	↑	*	*	→
Vorliegende Untersuchungen	HT-29	↑	↓	*	*
	Caco-2	↑	↓	*	*

Tab. IV. Heterogenität verschiedener Beobachtungen der Expressionsänderung von Bcl-2 Familienmitgliedern in Kolonkarzinomzellen unter Butyratinkubation. (↑: Expressions-steigerung; ↓: Expressionsminderung; →: keine Veränderung; *: nicht untersucht)

Der Hintergrund der verschiedenen, sich zum Teil widersprechenden Beobachtungen zur Expressionsänderung von Bcl-2-Familienmitgliedern in den

gleichen Zelllinien, hier als Beispiel HT-29 und Caco-2, ist noch ungeklärt. Eine mögliche Erklärung liefern hierfür Hague et al. (Hague, Diaz et al. 1997): verschiedene Kolonkarzinomzelllinien reagieren auf die Butyratwirkung mit unterschiedlichen Änderungen im Expressionsmuster der Bcl-2 Familienmitglieder. Unter der oft über Jahre dauernden Zellkultur gleicher Zelllinien in verschiedenen Labors könnten sich genetisch heterogene Zellpopulationen herausselektiert haben, die sich in ihrem Ansprechen auf Butyrat unterscheiden.

Interessant scheint in diesem Zusammenhang auch folgende Beobachtung: Kultiviert man normale Kolonepithelzellen unter Ausschluss von Butyrat, so kommt es zu einem Anstieg von pro-apoptotischem Bax mit darauffolgendem Zelltod (Hass, Busche et al. 1997). Kultiviert man allerdings maligne Kolonkarzinomzellen mit Butyrat so kommt es zu einem Anstieg von Bak, und einem gleichbleibenden Bax-Spiegel (Moss, Agarwal et al. 1996). Es scheint also so, als ob es verschiedene biochemische Mechanismen für die Induktion von Apoptose durch das Entziehen von Butyrat von normalen Kolonepithelzellen oder durch Zusetzen von Butyrat zu Kolonkarzinomzellen geben könnte.

Unter Acetylsalicylsäureinkubation kam es zu keiner Änderung in der Expression der untersuchten apoptoseregulierenden Faktoren in beiden Zelllinien. Als bisher einziges NSAID mit einem Effekt auf die Bcl-2 Familie steigert der aktive Sulindac-Metabolit Sulindac-Sulfid die Expression von Bak in IEC-18 Kolonepithelzellen und induziert Apoptose (Moss, Agarwal et al. 1996). Ob Acetylsalicylsäure seine pro-apoptotische Wirkung eventuell über andere Bcl-2 Proteine vermittelt ist noch ungeklärt.

Bei der Inkubation von HT-29 und Caco-2 Karzinomzellen mit einer Kombination aus Butyrat und Acetylsalicylsäure kommt es zu einer deutlich verstärkten Apoptoseinduktion verglichen mit dem Effekt der Einzelsubstanzen. Dennoch konnte keine Verstärkung des Effekts von Butyrat auf die Proteinspiegel von Bak oder Bcl-X_L durch Acetylsalicylsäure beobachtet werden. Die deutlich verstärkte Wirkung der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Wirkung

auf die Apoptoseinduktion in Kolonkarzinomzellen wird demnach nicht über die von uns untersuchten Faktoren der Apoptoseregulation vermittelt.

Zellzykluskontrolle

Die Proliferation jeder Zelle wird durch eine komplexe Maschinerie von Faktoren, der Zellzykluskontrolle, reguliert (Weinberg 1997). Störungen in dessen Ablauf können zur malignen Entartung einer Zelle führen und *vice versa* bietet die Beeinflussung des Zellzykluses eine Ansatzmöglichkeit in der Prävention und Behandlung maligner Tumoren (Sherr 1996; Arber, Doki et al. 1997).

Butyrat und viele NSAIDs, darunter Acetylsalicylsäure, blockieren den Zellzyklus in der G₀/G₁ Phase (Vaziri, Stice et al. 1998; Elder and Paraskeva 1999). Hinter dieser Wirkung steht eine Modulation der Expression zellzyklusregulierender Faktoren. Butyrat induziert in beiden untersuchten Zelllinien das zellzyklusblockierende Protein p21^{Waf1/Cip1} (Siavoshian, Blottiere et al. 1997). p21^{Waf1/Cip1} ist ein durch p53 reguliertes cdk-blockierendes Protein, welches bei Überexpression zu einem G₁-Arrest der Zelle führt (Harper, Elledge et al. 1995; Levine 1997). Desweiteren bindet p21^{Waf1/Cip1} an PCNA und inhibiert dadurch die DNA-Synthese, was ebenso zu einem Zellzyklusblock führt (Waga, Hannon et al. 1994; Cayrol, Knibiehler et al. 1998). Der durch die p21^{Waf1/Cip1}-Expression ausgelöste Wachstumsblock ist eng verknüpft mit der Differenzierung von Leukämiezelllinien und Kolonepithelzellen (Steinman, Hoffman et al. 1994; Zhang, Grasso et al. 1995; Evers, Ko et al. 1996).

Wang und Friedman konnten zeigen, dass dieselben Mischungen von kurzkettigen Fettsäuren, wie sie nach der Fermentation verschiedener Ballaststoffe im Kolonlumen auftreten p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1} in Kolonozyten induzieren (Wang and Friedman 1998).

In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass Butyrat nach 24 Stunden den p21^{Waf1/Cip1}-Proteinspiegel in beiden untersuchten Zelllinien erhöht. Die Expressionsteigerung von p21^{Waf1/Cip1} in HT-29 Zellen, sowie in Caco-2 Zellen verläuft p53 unabhängig, da zum einen Butyrat gleichzeitig die Expression von mutiertem p53 in HT-29 senkt und kein funktionelles p53-

Protein in Caco-2 Zellen nachgewiesen werden konnte. Butyrat und andere im Kolonlumen vorkommende Substanzen beeinflussen zwar die Expression von mutiertem und normalem p53 in Adenomzelllinien, dennoch ist die Induktion von Differenzierung, der Block des Zellzyklus und Apoptose durch Butyrat unabhängig von p53 (Hague, Manning et al. 1993; Janson, Brandner et al. 1997; Palmer, Paraskeva et al. 1997). Die Expressionsteigerung von p21^{Waf1/Cip1} geschieht direkt durch Aktivierung des Waf1/Cip1-Genpromoters durch Butyrat (Nakano, Mizuno et al. 1997).

In den durchgeführten Experimenten konnte nach anfänglicher Induktion des p21-Proteins ein Abfall nach 48h und noch deutlicher nach 76h beobachtet werden. Den Abfall der p21-Spiegel in Caco-2 Zellen nach 48h oder 72h konnten Litvak et al. nicht feststellen (Litvak, Evers et al. 1998). Unsere Ergebnisse stehen jedoch in Einklang mit den Ergebnissen von Chai et al., die erkannten, dass die durch Butyrat aktivierte Caspase 3 das p21-Protein nach dessen Induktion zerschneidet (Chai, Evdokiou et al. 2000). Ohne die Degradierung von p21^{Waf1/Cip1} kam es zu einer Blockierung der butyrat-induzierten Apoptose. Yamamoto et al. stellten fest, dass nach dem durch p21^{Waf1/Cip1}-vermittelten Ausscheren aus dem Zellzyklus, nur in HT-29 Zellen, welche einen späteren p21-Abfall zeigten, durch Butyrat Differenzierung ausgelöst werden konnte (Yamamoto, Soh et al. 1999). Kolonkarzinomzellen, welche p21^{Waf1/Cip1} überexprimieren, sind weniger sensibel gegenüber der butyrat-vermittelten Differenzierung.

Archer et al. konnten wiederum zeigen, dass die Induktion von p21^{Waf1/Cip1} für die antiproliferative Butyratwirkung auf Kolonkarzinomzellen zwingend erforderlich ist (Archer, Meng et al. 1998). Im Gegensatz dazu ist die Blockierung in der G1-Phase durch Butyrat in Fibroblasten nicht abhängig von der Erhöhung p21-Spiegel (Vaziri, Stice et al. 1998).

NSAIDs wirken ebenfalls p53-unabhängig auf kolorektale Karzinomzellen (Piazza, Rahm et al. 1997). Acetylsalicylsäure hat keinen Einfluss auf die Expression von p53 oder p21^{Waf1/Cip1} in HT-29 oder in Caco-2 Zellen bei Konzentrationen, welche dann in Kombination mit Butyrat getestet wurden. Erst

bei der Inkubation von HT-29 Zellen in Acetylsalicylsäure (5mM) kam es zu einer Induktion von p21^{Waf1/Cip1}.

Zellzyklusblockierung, terminale Differenzierung und Apoptose sind eng miteinander verknüpft. p21^{Waf1/Cip1} und dessen Degradierung spielen hierbei eine wichtige Rolle (Steinman, Hoffman et al. 1994; Archer, Meng et al. 1998; Litvak, Evers et al. 1998). Bei Inkubation von HT-29 Zellen mit einer Kombination von Butyrat und Acetylsalicylsäure konnte bei niedrigen Konzentrationen ein deutlich erhöhter Proteinspiegel an p21^{Waf1/Cip1} nachgewiesen werden, als bei Inkubation mit den Einzelsubstanzen. Die p21^{Waf1/Cip1}-Level zeigten den größten Anstieg, wie bei der Inkubation mit den Einzelsubstanzen, nach 24h, mit einem Abfall nach 48h bzw. 72h Inkubation von HT-29 Zellen. Dennoch scheint die Butyratwirkung, jedenfalls in höherer Konzentration aufgrund seines stärkeren Effekts auf die p21-Induktion die Wirkung von Acetylsalicylsäure zu überlagern.

Steinman et al. konnten zeigen, dass bei der Differenzierung von Leukämiezellen unter Butyratwirkung ein additiver Effekt auf die p21-Induktion beobachtet werden konnte, wenn die Zellen gleichzeitig mit einer weiteren differenzierungsfördernden Substanz behandelt wurden (Steinman, Hoffman et al. 1994). Bei höheren Butyratkonzentrationen konnte in unseren Experimenten kein Mehranstieg von p21^{Waf1/Cip1} bei Zugabe von Acetylsalicylsäure beobachtet werden.

p21^{Waf1/Cip1} interagiert mit PCNA und die Bindung an diesen Faktor kann einen weiteren Mechanismus der zellzyklusblockierenden Wirkung von p21^{Waf1/Cip1} darstellen (Waga, Hannon et al. 1994; Cayrol, Knibiehler et al. 1998). Interessanterweise stellte PCNA ebenso einen Faktor dar, auf welchen sich die Wirkung von Butyrat und Acetylsalicylsäure, wie oben erwähnt, deutlich verstärkten.

Ein anderes zellzyklusblockierendes Protein, p16^{Ink4}, konnte in den untersuchten Zellen nicht nachgewiesen werden. p16^{Ink4} wurde weder durch Butyrat, noch durch Acetylsalicylsäure oder die Kombination induziert. Damit konnten Beobachtungen von Siavoshian et al. bestätigt und erweitert werden, die die

Butyratwirkungen auf die Zellzykluskontrolle untersucht hatten (Siavoshian, Blottiere et al. 1997).

Höhere Butyratkonzentrationen senken den Spiegel an cdk2 in HT-29 Zellen (Siavoshian, Blottiere et al. 1997). Die Progression der Zelle durch die späte G₁-Phase in die S-Phase setzt die Aktivierung von cdk2 voraus (Ding, Ko et al. 1998). In der Kolonkrypte nimmt der Gehalt an cdk2 Protein in den Kolonozyten von der Kryptenbase zur Spitze hin ab (Chandrasekaran, Coopersmith et al. 1996). Die Zellproliferation und Differenzierung sind demnach mit Veränderungen im Expressionsmuster der cyclin-abhängigen Kinasen verknüpft.

Ein an cdk2 bindendes Protein ist das durch Butyrat induzierte p21^{Waf1/Cip1} (Harper, Elledge et al. 1995), welches allerdings schon bei niedrigeren Konzentrationen induziert wird, als notwendig sind, um die cdk2-Expression zu inhibieren. Zudem fallen die p21-Spiegel nach 72h wieder ab, zu dem Zeitpunkt, an dem die Senkung der cdk2-Konzentration in HT-29 Zellen am deutlichsten ist. Zusätzliche Mechanismen müssen demnach in den butyrat-behandelten Zellen ausgelöst werden.

NSAIDs und deren Metabolite verändern das Expressionsmuster von an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligten Cyclinen und cyclin-abhängigen Kinasen (Shiff, Qiao et al. 1995; Goldberg, Nassif et al. 1996). Shiff et al. konnten zeigen, dass Acetylsalicylsäure gleich dem Butyrat die Proteinexpression von cdk2 senkt (Shiff, Koutsos et al. 1996). Bei Inkubation von HT-29 Zellen mit 1.5mM Acetylsalicylsäure zeigte sich nach 72h ein Abfall von cdk2-Protein, den wir in unseren Experimenten bei dieser niedrigen Konzentration nicht feststellen konnten. Erst der Inkubation mit Acetylsalicylsäure (3mM) folgte ein, wenn auch minimaler, Abfall von cdk2, der sich deutlich erst bei einer Erhöhung der Acetylsalicylsäure-Konzentration auf 5mM beobachten ließ.

In Caco-2 Zellen konnte weder Butyrat noch Acetylsalicylsäure und die Kombination beider Substrate den cdk2-Proteinspiegel senken. Die von uns verwendeten Butyratkonzentrationen induzieren Differenzierung in Caco-2 Zellen (Litvak, Evers et al. 1998). Ding et al. konnten bei differenzierenden Caco-2 Zellen eine Abnahme der cdk2-Kinaseaktivität bei gleichbleibender

Expression von cdk2-Protein beobachten (Ding, Ko et al. 1998). Andere Studien beschreiben eine Abnahme der cdk2-Konzentration während der Differenzierung von Caco-2 Kolonkarzinomzellen (Evers, Ko et al. 1996).

Neben der Beeinflussung von weiteren Cyclin D-Unterformen, wie Cyclin D₁ in Fibroblasten, kommt es auch zu einer Induktion von Cyclin D₃ in HT-29 und Caco-2 Zellen durch Butyrat (Siavoshian, Blottiere et al. 1997; Vaziri, Stice et al. 1998). Siavoshian et al. deuteten die Expressionssteigerung von D-Cyclinen als einen Mechanismus der Zelle den Zellzyklus in G₁ zu blockieren (Siavoshian, Blottiere et al. 1997). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cyclin D die Proliferation von Epithelzellen durch eine Zellzyklusblockade in G₁ hemmen konnte (Pagano, Theodoras et al. 1994). Die Induktion von Cyclin D₃ ist verknüpft mit der butyrat-induzierten Differenzierung von Kolonkarzinomzellen (Siavoshian, Segain et al. 2000). Weiterhin interagiert Cyclin D₃ mit PCNA und vermag hierdurch eventuell einen anti-proliferativen Effekt zu vermitteln (Xiong, Zhang et al. 1992). Im zeitlichen Verlauf kommt es nach 48h bzw. 72h Butyratwirkung wieder zu einem Abfall der Cyclin D₃ Konzentration in HT-29 und Caco-2 Zellen. Wie jener Cyclin D-Abfall erklärt werden kann, ist noch unklar.

Chandrasekaran und Mitarbeiter konnten in verschiedenen transgenen Mäusen feststellen, dass der Cyclin D₁-Gehalt und jener von cdk2 entlang der Darmschleimhaut nach luminal abfällt (Chandrasekaran, Coopersmith et al. 1996). Die Autoren schlossen daraus, dass die terminale Differenzierung der mukosalen Epithelzellen mit einem Abfall an Cyclin D₁, sowie auch cdk2, einhergeht.

Butyrat und Acetylsalicylsäure verstärken sich in ihrer Wirkung auf cdk2 in HT-29 Zellen, nicht aber auf Cyclin D₃. In unseren Experimenten kommt es unter Butyrat zur Induktion von Differenzierung in HT-29 Zellen und marginal auch durch Acetylsalicylsäure. Die Inkubation mit der Kombination resultiert zwar in einem prägnant verstärkten Abfall von cdk2, nicht jedoch in einer Verstärkung der differenzierenden Wirkung des Butyrats.

In den durchgeführten Zellkulturexperimenten konnte ein sich verstärkender Effekt der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination auf HT-29 und ebenso auf

Caco-2 Zellen beobachtet werden. Dennoch zeigten sich Unterschiede in den Veränderungen im Proteinmuster der untersuchten Kolonzellen: cdk2 wurde weder durch eine Butyrat-, Acetylsalicylsäure-, noch durch die Kultur in verschiedenen Kombinationen in Caco-2 Zellen im Vergleich zur Kontrolle gesenkt.

Die unterschiedliche Sensibilität von Karzinomzellen auf die Behandlung mit Substanzen, welche ihre Proliferation inhibieren und Apoptose auslösen, kann auf ihrem heterogenen genetischen Hintergrund beruhen. So konnten He und Mitarbeiter zeigen, dass Mutationen in wichtigen Onkogenen und die Expression von Rezeptoren für NSAID eng verknüpft sind (He, Chan et al. 1999). Ähnliche Unterschiede können dazu beigetragen haben, dass HT-29 und Caco-2 Zellen unterschiedlich auf die durchgeführten Inkubationen reagiert haben. Dennoch konnten in beiden Zelllinien Butyrat und Acetylsalicylsäure gemeinsam deutlichere Wirkungen aufweisen als die Einzelsubstanzen, was in der Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms von Bedeutung sein kann.

Aufgrund der in der Einleitung genannten Nebenwirkungen einer langjährigen Einnahme von nicht-selektiven Cox-Inhibitoren müssen Strategien entwickelt werden, welche unerwünschten Begleiterscheinungen verhindern oder zumindest abmildern. Die Kombination von mehreren Substanzen mit vermuteter karzinoprotektiver Wirkung kann hierbei einen Lösungsansatz bieten. Die Kombination von Sulindac mit Lovastatin, einem Hemmer der HMG-CoA-Reduktase, zeigt einen grösseren Effekt auf das Wachstum und die Apoptose von Kolonkarzinomzellen, als die Summe der Einzelsubstanzen (Agarwal, Rao et al. 1999). Gleiches lässt sich im Tiermodell mit azoxymethan-induzierter Karzinogenese beobachten (Agarwal, Rao et al. 1999).

Neben der hier vorliegenden Dissertation sind kürzlich mehrere Wirkstoffkombinationen und Strategiemodelle zur Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms vorgeschlagen worden: Butyrat und Proteinkinaseinhibitoren, wie Staurosporin, wirken synergistisch auf Kolonkarzinomzellen (Medina, Edmonds et al. 1997), eine Aktivierung der Proteinkinase C vor Butyratinkubation verstärkt dessen Wirkung (Rickard,

Gibson et al. 1999) und die synergistische Wirkung einer Kombination von Acetylsalicylsäure und einem Ornithindecaboxylase-Hemmer auf die Kolonkarzinogenese im Rattenmodell wurden beschrieben (Li, Schut et al. 1999).

Butyrat und Acetylsalicylsäure verstärken sich in ihrer Wirkung auf Kolonkarzinomzellen *in vitro*. Einen möglichen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Butyrat und der von Cyclooxygenasehemmern sahen zunächst Tsujii und DuBois (Tsujii and DuBois 1995). Die Überexpression von Cox-2 in Kolonepithelzellen schützt die Zellen vor der Induktion von Apoptose durch Butyrat (Tsujii and DuBois 1995). Eine gleichzeitige Hemmung des Prostaglandinstoffwechsels durch Blockierung der Cyclooxygenasen und Induktion von Apoptose durch Butyrat stellt deshalb eine attraktive Strategie in der Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms dar.

Einen verstärkten Effekt im Zellkulturexperiment konnten Crew et al. bei der Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat und dem selektiven Cox-2 Hemmer NS-398 zeigen. Bei Koinkubation der Zellen mit Butyrat (2mM) und NS-398 (100µM) für 72h zeigte sich eine verstärkte Wirkung auf die Zellproliferation und Apoptoseinduktion verglichen mit dem Effekt von Butyrat allein (Crew, Elder et al. 2000). Die Mechanismen hinter der sich verstärkenden Wirkung von Butyrat und Cyclooxygenasehemmern sind noch unklar.

Crew et al. beobachteten einen Anstieg der Cox-2- Expression bei der Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat (2mM, 72h) (Crew, Elder et al. 2000). Butyrat scheint demnach seiner pro-apoptotischen Wirkung durch die Hochregulation von Cox-2 entgegenzuwirken, da Kolonzellen, welche Cox-2 überexprimieren, sich gegenüber der butyrat-induzierten Apoptose resistent zeigen (Tsujii and DuBois 1995). Erst die Blockierung von Cox-2 durch Sulindac sensibilisiert die Zellen wieder für die Butyratwirkung (Tsujii and DuBois 1995). Die Expression von Cox-2 scheint eng durch das APC-Gen reguliert zu werden, da APC^{Δ716}-knockout Mäuse eine erhöhte Cox-2 Expression in ihrer GIT-Mukosa aufweisen (Oshima, Dinchuck et al. 1996). Eine gleichzeitig eingeführte

Cox-2 Mutation, welche mit einer Inaktivierung des Gens einherging, oder eine Behandlung mit Cox-2 spezifischen Cyclooxygenaseinhibitoren reduzierte die Anzahl und die Grösse der Polypen in diesem Mausmodell deutlich (Oshima, Dinchuck et al. 1996). Die beobachteten Ergebnisse zeigen einen direkten genetischen Zusammenhang zwischen einer Mutation im APC-Gen und der Cox-2 Expression. Die von uns untersuchte Zelllinie HT-29 zeigt ein mutiertes APC-Gen. Werden die HT-29 Zellen mit dem vollständigen, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehenden APC-Gen transfiziert, zeigt sich bei Expression des APC-Proteins ein Abfall des Cox-2 Spiegels und die Induktion von Apoptose (Hsi, Angerman-Stewart et al. 1999).

Butyrat zeigt unterschiedliche Wirkungen auf HT-29-APC-Zellen (Expression des vollständigen APC-Gens) und HT-29 (mutiertes APC). In HT-29 Zellen induziert Butyrat die Expression des Cox-2 Proteins (Crew, Elder et al. 2000), während sich in HT-29-APC kein Einfluss von Butyrat auf die Cox-2 Expression nachweisen lässt (Hsi, Angerman-Stewart et al. 1999). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Butyrat in HT-29-APC Zellen Cox-2 zwar ebenfalls induziert, dieser Wirkung aber die Cox-2 senkende Wirkung des APC-Gens entgegensteht und somit als Resultat ein gleichbleibend konstanter Cox-2 Spiegel beobachtet wird.

Crew et al. sahen in der Hochregulation von Cox-2 durch Butyrat einen möglichen Mechanismus der sich verstärkenden Wirkung von Butyrat und Cox-Hemmern, welcher in Zellen, die kein Cox-2 exprimieren nicht beobachtet werden konnte (Crew, Elder et al. 2000). Nach Ansicht der Autoren sensibilisiert ein Cox-2 spezifischer Cyclooxygenaseinhibitor die Tumorzellen für die durch Butyrat induzierte Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion.

Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie eine Abnahme der Cox-2 Expression unter Butyratinkubation in ebenfalls APC-mutierten Caco-2 Zellen, in denen wir in der vorliegenden Arbeit gleichfalls einen verstärkten Effekt der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination zeigen konnten (Kamitani, Geller et al. 1998). Die Zugabe des Cox-2 spezifischen Inhibitors Indomethacin bei gleichzeitiger Butyratinkubation, reduzierte zwar die Expression von Cox-2 noch

deutlicher, die Apoptoseinduktion durch Butyrat ließ sich dadurch jedoch nicht verstärken (Kamitani, Geller et al. 1998).

In einer bisher unveröffentlichten Studie sahen Elder et al. einen additiven Effekt der Kombination von Butyrat und Salicylat, dem aktiven Metaboliten von Acetylsalicylsäure, auf die Proliferation von HT-29 Zellen (Crew, Elder et al. 2000). Sie erklärten die „nur“ additive Proliferationshemmung mit der mangelnden Wirkung von Acetylsalicylsäure auf Cox-2 (bei überwiegender Wirkung auf Cox-1). Die möglicherweise verstärkte Apoptoseinduktion wurde nicht untersucht. Bei der Koinkubation der von uns untersuchten Zellen mit Acetylsalicylsäure und Butyrat sahen wir einen potentiell überadditiven (synergistischen) Effekt auf die Proliferation und Apoptose der beiden erwähnten Zelllinien HT-29 und Caco-2. Beide untersuchten Zelllinien exprimieren Cox-2 (Elder, Halton et al. 1997; Tsujii, Kawano et al. 1997). Die Diskrepanz zwischen der unterschiedlichen Expressionsänderung von Cox-2 unter Inkubation mit Butyrat in den erwähnten Studien und der von uns beobachteten identischen Reaktion auf die Inkubation mit der Kombination mit Butyrat und Acetylsalicylsäure läßt einen cox-unabhängigen Mechanismus der deutlich verstärkten Wirkung der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination vermuten. Bestätigt wird diese Vermutung von Yamamoto et al., welche in HCT-15-Zellen, bei fehlender Produktion von Prostaglandinen, eine Induktion von Apoptose durch Acetylsalicylsäure beobachten konnten (Yamamoto, Yin et al. 1999). Es ist wahrscheinlich, dass Butyrat und Acetylsalicylsäure in verschiedene Mechanismen und Signalwege eingreifen und so ihre Wirkung auf Kolonkarzinomzellen vermitteln. Die Wirkung auf den Prostaglandinstoffwechsel muss dabei nicht im Vordergrund stehen, da NSAID-Metaboliten, welche keinen Effekt auf die Cyclooxygenasen ausüben, das Wachstum von Kolonkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* blockieren (Piazza, Rahm et al. 1995; Reddy, Kawamori et al. 1999). In manchen Cox-2 exprimierenden Kolonkarzinomzellen hemmen die NSAIDs die Proliferation und lösen Apoptose aus, ohne die Proteinspiegel von Cox-2 zu verändern (Elder, Halton et al. 1997). Embryonale Mausfibroblasten, welche kein Cox-1 oder Cox-2 exprimieren, sind ebenso empfänglich für die anti-proliferativen und pro-

apoptotischen Wirkungen von NSAIDs (Zhang, Morham et al. 1999). Die benötigte Konzentration für die Blockierung von Cox-2 durch den selektiven Cox-Hemmer NS-398 ist um ein vielfaches niedriger als die Konzentration, welche eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion bewirkt (Elder, Halton et al. 1997; Crew, Elder et al. 2000). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die nicht-steroidalen Antiphlogistika, darunter Acetylsalicylsäure, in der Zelle weitere Mechanismen aktivieren, welche ihre Wirkungen auf die Karzinomzelle vermitteln.

Acetylsalicylsäure, Salicylate und NSAIDs, wie etwa Sulindac, verhindern die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Kopp and Gosh 1994; Yamamoto, Yin et al. 1999). Die Aktivierung des NF κ B-Signalweges schützt die Zelle vor der TNF α -induzierten Apoptose, während dessen Blockierung die apoptoseauslösende Wirkung von TNF α verstärkt (McDade, Perugini et al. 1999). In unseren Experimenten konnten wir eine Verhinderung der Phosphorylierung und Degradation von I κ B α , eines NF κ B-blockierenden Proteins, durch Butyrat beobachten. Immunhistochemische Untersuchungen konnten bestätigen, dass Butyrat die Translokation von NF κ B vom Zytoplasma in den Zellkern nach TNF α -Stimulation von Kolonkarzinomzellen verhindert (Lührs, Schaubert et al. 1999). Da NF κ B neben der Regulation von entzündlichen Reaktionen auch in die Proliferations- und Apoptosekontrolle eingreift, stellt dieser Signalweg ein potentielles Ziel für die karzinomprotektive Wirkung von Acetylsalicylsäure und NSAIDs dar (Baeuerle and Baltimore 1996). Die Blockierung von NF κ B geschieht unabhängig vom Prostaglandinstoffwechsel, da sie in Zellen, welche keine Cyclooxygenasen exprimieren, sowie durch Sulindacmetaboliten, die keinen Einfluss auf den Prostaglandinstoffwechsel haben, gleichermassen ausgelöst wird (Yamamoto, Yin et al. 1999). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Butyrat und Acetylsalicylsäure Kolonkarzinomzellen für die durch das NF κ B-aktivierende Zytokin TNF α ausgelöste Apoptose sensitivieren (Giardina, Boulares et al. 1999).

Butyrat und Acetylsalicylsäure blockieren beide die Aktivierung von NF κ B durch eine Inhibition der Degradation von I κ B-Proteinen. Dies könnte ein Erklärungsmodell für die von uns beobachtete verstärkte pro-apoptotische und anti-proliferative Wirkung ihrer Kombination darstellen.

NSAIDs, darunter Salicylate und selektive Cox-2 Hemmer, sind Liganden an der Rezeptorgruppe der PPAR-Familie (peroxisome proliferator-activated receptor) (Lehmann, Lenhard et al. 1997). Diese gliedert sich in mehrere Subtypen, u.a. PPAR γ und PPAR δ , welche als Liganden-abhängige Aktivatoren der DNA-Transkription fungieren. Die Fähigkeit an PPAR-Rezeptoren zu binden ist allerdings unabhängig von der Fähigkeit den Prostaglandinstoffwechsel zu beeinflussen, da auch NSAID-Metabolite ohne Einfluss auf die Cyclooxygenasen PPAR aktivieren können (He, Chan et al. 1999). Su et al. konnten weiterhin zeigen, dass Liganden an PPAR γ die Aktivierung von NF κ B durch die Blockierung der Degradation von I κ B α in HT-29 und Caco-2 Zellen verhindern (Su, Wen et al. 1999).

Die PPAR-Rezeptoren spielen neben dem Lipid- und Hormonstoffwechsel wahrscheinlich eine Rolle in der kolorektalen Karzinogenese (DuBois, Gupta et al. 1998; He, Chan et al. 1999). Kolonkarzinomzellen zeigen eine erhöhte Expression von PPAR γ als normale kolorektale Epithelzellen (DuBois, Gupta et al. 1998). Weiterhin folgt der Aktivierung von PPAR γ eine Proliferationshemmung in Kolonkarzinomzellen und die Hemmung der Tumorstadiumsrate im Nacktmausmodell (Sarraf, Mueller et al. 1998). Die Aktivierung von PPAR-Rezeptoren resultiert in einem Abfall der Cox-2-Spiegel in HT-29 Zellen und einer Verminderung des aggressiven Wachstums von Kolonkarzinomzellen (Kuwada, Scaife et al. 1999). In malignen Kolonzellen steigert die Inkubation mit Aktivatoren an PPAR-Rezeptoren die Zelldifferenzierung, was sich in einem Anstieg der Differenzierungsmarker CEA und Alkalische Phosphatase zeigte (Sarraf, Mueller et al. 1998; Kitamura, Miyazaki et al. 1999). Der von uns beobachtete Anstieg der CEA-Expression in HT-29 Zellen unter Acetylsalicylsäureinkubation könnte demzufolge durch die Ligandenaktivität des Acetylsalicylsäures an PPAR-Rezeptoren erklärt werden.

Dennoch zeigten die untersuchten PPAR γ -exprimierenden Caco-2 Zellen keine Veränderung in ihrem Differenzierungsgrad in unseren Experimenten, und die durch Acetylsalicylsäure induzierte Differenzierung in HT-29 Zellen konnte bei Inkubation mit der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination die durch Butyrat ausgelöste CEA-Steigerung nicht verstärken. Gleichzeitig geht *vice versa* die Induktion von Differenzierung in den beiden Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und HT-29 mit einer erhöhten Expression von PPAR γ einher (Lefebvre, Paulweber et al. 1999). In unseren eigenen Experimenten konnten wir in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen zeigen, dass Butyrat die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen steigert (Barnard and Warwick 1993; Basson, Turowski et al. 1996). Eine erhöhte Expression von PPAR-Rezeptoren im Zuge der butyrat-induzierten Differenzierung würde Acetylsalicylsäure und anderen NSAIDs eine erhöhte Anzahl von Zielrezeptoren bieten, durch deren Aktivierung sie ihren Effekt auf die Zelle vermitteln könnten. Dies wiederum stellt ein alternatives Erklärungsmodell für die Wirkungsverstärkung der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination dar. Tatsächlich konnte in unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt werden, dass Butyrat die Expression von PPAR γ in Kolonkarzinomzellen steigert (Weber, Lührs et al 2000). Ein weiterer Hinweis in diesem Zusammenhang kann die Beobachtung von Morrison et al. sein, welche zeigen konnten, dass die PPAR γ -induzierte Differenzierung in Adipozyten mit einer Induktion von u.a. p21^{Waf1/Cip1} einherging (Morrison and Farmer 1999). In unseren Experimenten konnten wir einen deutlich verstärkten Effekt der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination auf die Induktion der Expression von p21^{Waf1/Cip1} im Vergleich zu den Einzelsubstanzen zeigen.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass Butyrat das Wachstum von Kolonkarzinomzellen hemmt, Differenzierung induziert und Apoptose auslöst. Einen möglichen Mechanismus hinter dieser Wirkung stellt die Induktion von pro-apoptotischen Faktoren, sowie die Induktionshemmung von anti-apoptotischen Proteinen dar. Gleichzeitig verändert Butyrat das Expressionsmuster wichtiger, den Zellzyklus regulierender, Proteine. Acetylsalicylsäure hemmt ebenfalls die Proliferation und induziert den

programmierten Zelltod in kolorektalen Karzinomzellen. Bei der Inkubation der untersuchten Kolonkarzinomzelllinien mit einer Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination konnte erstmals eine, den Effekt der Einzelsubstanzen deutlich übertreffende, Wirkung auf die Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion beobachtet werden. Die identifizierte Potenzierung des Einflusses der Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination auf die zellzyklusregulierenden Faktoren p21^{Waf1/Cip1} und cdk2 könnte hierfür ein Erklärungsmodell liefern. Weiterhin könnte die Blockierung der Aktivierung von NFκB durch Butyrat die pro-apoptotische Wirkung von Acetylsalicylsäure auf diesen Faktor verstärken.

Butyrat, als Abbauprodukt von im Kolon fermentierten Ballaststoffen, und Acetylsalicylsäure verstärken sich in ihrer Wirkung auf Kolonkarzinomzellen. In der Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms kann dieser Effekt, die sich potenzierende Wirkung von ballaststoffreicher Diät und die regelmäßige Einnahme von Acetylsalicylsäure, von großer Bedeutung sein. Weitere experimentelle Arbeiten sind notwendig, um die genauen Mechanismen hinter den Wirkungen der Butyrat-Acetylsalicylsäure-Kombination auf die Proliferation und Apoptose von Kolonkarzinomzellen zu klären.

5 Zusammenfassung

Zahlreiche experimentelle und epidemiologische Studien schreiben der kurzkettigen Fettsäure Butyrat und dem Cyclooxygenasehemmer Acetylsalicylsäure eine Schutzwirkung auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms zu. Die genauen Mechanismen hinter der Wirkung beider Substanzen sind noch ungeklärt. Um die Effekte von Butyrat und Acetylsalicylsäure, sowie deren Kombination, auf das Wachstum, die Differenzierung und Apoptose von Kolonkarzinomzellen zu untersuchen, wurden Zellkulturexperimente und Western Blot Analysen durchgeführt.

Unter Butyratinkubation kam es zu einer Steigerung der Differenzierung von HT-29-Kolonkarzinomzellen, jedoch nicht von Caco-2 Zellen. Acetylsalicylsäure allein hatte keinen relevanten Effekt auf die Zelldifferenzierung und in Kombination konnte Acetylsalicylsäure die differenzierende Wirkung des Butyrats nicht verstärken. Butyrat und Acetylsalicylsäure hemmten die Proliferation der untersuchten kolorektalen Karzinomzellen. Bei Inkubation der Kolonkarzinomzellen mit einer Kombination von Butyrat und Acetylsalicylsäure wurde der antiproliferative Effekt der Einzelsubstanzen deutlich verstärkt. Im Western-Blot konnte diese Beobachtung durch Untersuchung des Proliferationsmarkers PCNA bestätigt werden. Gleichzeitig veränderte sich das Expressionsmuster zellzyklusregulierender Proteine in den untersuchten Zellen: Die Cyclin D₃-Expression wurde in Caco-2 Zellen sowie in HT-29 Zellen durch Butyratinkubation erhöht. In Kombination mit Acetylsalicylsäure verstärkte sich die Wirkung von Butyrat auf die Expression von p21^{Waf1/Cip1} und cdk2: Acetylsalicylsäure und Butyrat in höheren Konzentrationen reduzierten die Expression von cdk2 in HT-29 Zellen, in niedrigen Konzentrationen führte nur die Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination zu einem Abfall des cdk2-Proteingehalts. Butyrat induzierte die Expression des cdk-Inhibitors p21^{Waf1/Cip1} in beiden Kolonkarzinomzelllinien. Die Wirkung auf p21^{Waf1/Cip1} war hierbei p53-unabhängig, da es gleichzeitig zu einem Abfall der Konzentration an p53-

Protein in HT-29 Zellen kam und in Caco-2 Zellen kein p53 nachweisbar war. Acetylsalicylsäure hatte erst in höherer Konzentration einen Einfluss auf die p21^{Waf1/Cip1} Proteinexpression in HT-29 Zellen. Die Kombination von Butyrat und Acetylsalicylsäure jedoch übertraf in ihrer Wirkung die des Butyrats schon bei Konzentrationen, bei denen die alleinige Butyratinkubation ohne Effekt blieb. Weiterhin induzierte Butyrat, über einen Anstieg der Expression des proapoptischen Faktors Bak, Apoptose in den untersuchten Kolonkarzinomzellen, bei gleichzeitigem Abfall des anti-apoptischen Bcl-X_L. Bei Inkubation mit der Acetylsalicylsäure-Butyrat-Kombination kam es zu einer deutlichen Verstärkung der Apoptoseinduktion, wobei Acetylsalicylsäure die Wirkung des Butyrats auf Bak und Bcl-X_L jedoch nicht steigerte. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Effekt des Butyrats mit einer Inhibition der Phosphorylierung und Degradation von I κ B α , und damit einer Verhinderung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B einhergeht, was die Wirkung von apoptose-induzierenden Substanzen verstärken kann.

Zusammenfassend zeigte sich bei Kombination der Einzelsubstanzen Butyrat und Acetylsalicylsäure eine Verstärkung ihrer Wirkung auf die Zellproliferation, sowie die Apoptoseinduktion bei Kolonkarzinomzellen. Dieser Effekt wird durch unterschiedliche molekulare Mechanismen vermittelt, wobei mit p21^{Waf1/Cip1} und cdk2 erstmals Faktoren ermittelt wurden, auf deren Expression Butyrat und Acetylsalicylsäure additive oder potentiell synergistische Effekte haben. Weitere Untersuchungen sind notwendig um die Verstärkung der Wirkung auf die Apoptoseinduktion näher zu charakterisieren.

6 Verwendete Abkürzungen

Ab: antibody /Antikörper
AP: Alkalische Phosphatase
ASS: Acetylsalicylsäure
ATCC: American Type Culture Collection
BSA: Bovines Serumalbumin (syn. FBS: fetal bovine serum)
But: Butyrat
CEA: Carcinoembryonales Antigen
Cox-2: Cyclooxygenase-2
EGTA: Ethylenglykolbis-(aminoethylether)-tetraacetat
HRP: horseradishperoxidase
I κ B α : inhibitory protein κ B α
mA: Milliampère
mM: millimolar
mm: mouse murine / Maus
Na₃VO₄: Natriumorthovanadat
NaCl: Natriumchlorid
NaF: Natriumfluorid
NEAA: non-essential amino acids
NF κ B: nuclear factor κ B
NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drugs
O/n: overnight / über Nacht
pAb: polyclonal antibody / Polyklonaler Antikörper
PBS: phosphate buffered saline
PCNA: proliferating cell nuclear antigen
PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor
PVDF: Polyvinylidifluorid
rb: rabbit / Kaninchen
RPM: Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT: Raumtemperatur
SDS-PAGE: sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis
TBS: Tris buffered saline
TNF α : Tumornekrosefaktor α
Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween: Polyoxyethylensorbitan
U: units (Internationale Einheiten)

7 Literaturverzeichnis

- Adams, J. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell death." Science **281**: 1322-1326.
- Agarwal, B., C. Rao, et al. (1999). "Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac." Gastroenterology **117**(4): 838-847.
- Aoki, T., C. Boland, et al. (1996). "Aspirin modulation of premalignant biomarkers in rectal mucosa of high-risk subjects." Gastroenterology **110**(4): A484.
- Arber, N., Y. Doki, et al. (1997). "Antisense to Cytin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells." Cancer Res **57**: 1569-74.
- Archer, S., S. Meng, et al. (1998). "Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways." Surgery **124**(2): 248-53.
- Archer, S. Y., S. Meng, et al. (1998). "p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12):6791-6.
- Baeuerle, P. and D. Baltimore (1996). "NF-kappaB: Ten years after." Cell **87**: 13-20.
- Barnard, J. A. and G. Warwick (1993). "Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells." Cell Growth Differ **4**(6): 495-501.
- Barnes, C. J. and M. Lee (1998). "Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin." Gastroenterology **114**(5): 873-7.
- Bartram, H. P., W. Scheppach, et al. (1993). "Proliferation of human colonic mucosa as an intermediate biomarker of carcinogenesis: effects of butyrate, deoxycholate, calcium, ammonia, and pH." Cancer Res **53**(14): 3283-8.
- Basson, M. D., G. A. Turowski, et al. (1996). "Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate." Dig Dis Sci **41**(10): 1989-93.
- Bedi, A., P. Pasricha, et al. (1995). "Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer." Cancer Res **55**: 1811-16.
- Beg, A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death." Science **274**: 782-4.
- Beg, A., W. Sha, et al. (1995). "Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappaB." Nature **376**: 167-70.
- Bonnotte, B., N. Favre, et al. (1998). "Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate." Cell Death Differ **5**(6): 480-7.

Boxberger, F., F. Richter, et al. (1999). "Effects of short-chain fatty acids on proliferation and differentiation are associated with a reduction in ERK phosphorylation in HT-29 cells." Gastroenterology **116**(4): A381.

Castano, E., M. Dalmau, et al. (1999). "Aspirin induces cell death and caspase-dependent phosphatidyl-serine externalization in HT-29 human colon adenocarcinoma cells." Br J Cancer **81**(2): 294-9.

Cayrol, C., M. Knibiehler, et al. (1998). "p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells." Oncogene **16**: 311-320.

Chai, F., A. Evdokiou, et al. (2000). "Involvement of p21 waf1/cip1 and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate." Carcinogenesis **21**(1): 7-14.

Chandrasekaran, C., C. Coopersmith, et al. (1996). "Use of normal and transgenic mice to examine the relationship between terminal differentiation of intestinal epithelial cells and accumulation of their cell cycle regulators." J Biol Chem **271**: 28414-21.

Compher, C. W., W. L. Frankel, et al. (1999). "Wheat bran decreases aberrant crypt foci, preserves normal proliferation, and increases intraluminal butyrate levels in experimental colon cancer." JPEN J Parenter Enteral Nutr **23**(5): 269-77; 277-8.

Craven, P. and F. DeRubertis (1992). "Effects of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis." Carcinogenesis **13**(4): 541-546.

Crew, T., D. Elder, et al. (2000). "A cyclooxygenase-2 (Cox-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing Cox-2 protein: regulation of Cox-2 by butyrate." Carcinogenesis **21**(1): 69-77.

Csordas, A. (1996). "Butyrate, aspirin and colorectal cancer." Eur J Cancer Prevent **5**: 221-231.

Cummings, J. (1981). "Short chain fatty acids in the human colon." Gut **22**: 763-779.

Cummings, J. H., E. W. Pomare, et al. (1987). "Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood." Gut **28**: 1221-7.

D'Argenio, G., V. Cosenza, et al. (1996). "Butyrate enemas in experimental colitis and protection against large bowel cancer in a rat model." Gastroenterology **110**: 1727-34.

Dimberg, J., A. Samuelsson, et al. (1999). "Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer." Gut **45**: 730-732.

Ding, Q., T. Ko, et al. (1998). "Caco-2 intestinal cell differentiation is associated with G1 arrest and suppression of cdk2 and cdk4." Am J Physiol **275**(44): C1193-200.

DuBois, R., R. Gupta, et al. (1998). "The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers." Carcinogenesis **19**(1): 49-53.

Elder, D., A. Hague, et al. (1996). "Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines: enhanced apoptosis in carcinoma and in vitro-transformed adenoma relative to adenoma cell lines." Cancer Res **56**: 2273-2276.

Elder, D., D. Halton, et al. (1997). "Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (Cox-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from Cox-2 protein expression." Clin Cancer Res **3**: 1679-83.

Elder, D. and C. Paraskeva (1999). "Induced apoptosis in the prevention of colorectal cancer by non-steroidal anti-inflammatory drugs." Apoptosis **4**: 365-72.

Evers, B., T. Ko, et al. (1996). "Cell cycle suppression and p21 induction in differentiating Caco-2 cells." Am J Physiol **271**: G722-7.

Fogh, J. (1977). J Natl Cancer Inst **58**: 209-214.

Fogh, J. e. (1975). Human tumor cells in vitro. New York, Plenum Press: 115-159.

Gamet, L., D. Daviaud, et al. (1992). "Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29." Int J Cancer **52**(2): 286-9.

Giardiello, F., E. Spannhake, et al. (1998). "Prostaglandin levels in human colorectal mucosa. Effects of sulindac in patients with familial adenomatous polyps." Dig Dis Sci **43**(2): 311-316.

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

Giovannucci, E., K. Egan, et al. (1995). "Aspirin and the risk of colorectal cancer in women." New Engl J Med **333**(10): 609-614.

Giovannucci, E., E. Rimm, et al. (1994). "Aspirin use and the risk for colorectal cancer in male health professionals." Ann Int Med **121**(4): 241-246.

Goldberg, Y., I. Nassif, et al. (1996). "The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle -regulatory proteins." Oncogene **12**: 893-901.

Green, D. and J. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**: 1309-1312.

Greenberg, E., J. Baron, et al. (1993). "Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users." J Natl Cancer Inst **85**(11): 912-916.

Hague, A., G. D. Diaz, et al. (1997). "bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis." Int J Cancer **72**(5): 898-905.

Hague, A., D. Elder, et al. (1995). "Apoptosis in colorectal tumour cells: Induction by the short-chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate." Int J Cancer **60**: 400-406.

Hague, A., A. M. Manning, et al. (1993). "Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer." Int J Cancer **55**(3): 498-505.

Hague, A., M. Moorghen, et al. (1994). "bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas." Oncogene **9**: 3367-3370.

Hague, A. and C. Paraskeva (1995). "The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines." Eur J Cancer Prevent **4**: 359-364.

Hague, A., B. Singh, et al. (1997). "Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate [editorial] [see comments]." Gastroenterology **112**(3): 1036-40.

Hall, P., P. Coates, et al. (1994). "Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: importance of apoptosis." J Cell Sci **107**: 3569-3577.

Harper, J., S. Elledge, et al. (1995). "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21." Mol Biol Cell **6**: 387-400.

Hass, R., R. Busche, et al. (1997). "Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig [comment]." Gastroenterology **112**(3): 875-81.

He, T., T. Chan, et al. (1999). "PPARdelta is an APC-regulated target of non-steroidal anti-inflammatory drugs." Cell **99**: 335-45.

Heath, C., M. Thun, et al. (1994). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs and human cancer." Cancer **74**: 2885-2888.

Heerdt, B., et al. (1994). "Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines." Cancer Res **54**: 3288-94.

Howe, G., E. Benito, et al. (1992). "Dietary intake of fibre and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies." J Natl Cancer Inst **84**(24): 18887-1895.

Hsi, L., J. Angerman-Stewart, et al. (1999). "Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the transitional level." Carcinogenesis **20**(11): 2045-49.

Ihde, D. and D. Longo (1998). Presentations of the patient with cancer: solid tumours in adults. Harrison's Principles of Internal Medicine. A. Fauci, E. Braunwald, K. Isselbacher and et al. New York, McGraw-Hill: 360-362.

Jackson, L. and C. Hawkey (1999). "NSAIDs and the GI tract-potential hazards and benefits." Apoptosis **4**: 397-402.

Jacoby, R., D. Marshall, et al. (1996). "Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc Min mouse model by the non-steroidal anti-inflammatory drug piroxicam." Cancer Res **56**: 710-714.

Janson, W., G. Brandner, et al. (1997). "Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53-independent differentiation and apoptosis." Oncogene **15**: 1395-1406.

Kamitani, H., M. Geller, et al. (1998). "Expression of 15-Lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation." J Biol Chem **273**(34): 21569-77.

Kiefer, M., M. Brauer, et al. (1995). "Modulation of apoptosis by the widely distributed bcl-2 homologue bak." Nature **374**: 736-739.

Kinzler, K. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**: 159-170.

Kitamura, S., Y. Miyazaki, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells." Jpn J Cancer Res **90**(1): 75-80.

Kopp, E. and S. Gosh (1994). "Inhibition of NF-kappaB by sodium salicylate and aspirin." Science **265**: 956-59.

Korsmeyer, S. (1999). "Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death." Cancer Res **59**(Suppl.): 1693s-700s.

Krajewska, M., S. Moss, et al. (1996). "Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas." Cancer Res **56**: 2422-2427.

Krajewski, S., M. Krajewski, et al. (1994). "Immunohistochemical determination of in vivo distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2." Amer J Pathol **145**: 1323-1336.

Kudlich, T. (2001). M.D.-Thesis, University of Würzburg.

Kuwada, S., C. Scaife, et al. (1999). "PPARalpha activation decreases Cox-2 levels and tumorigenicity in human colon cancer cells." Gastroenterology **116**(4): G1964.

Lefebvre, A., et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells." J Endocrinol **162**: 331-40.

Lehmann, J., J. Lenhard, et al. (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs." J Biol Chem **272**(6): 3406-10.

Levine, A. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**: 323-31.

Li, H., H. A. Schut, et al. (1999). "Prevention by aspirin and its combination with alpha-difluoromethylornithine of azoxymethane-induced tumors, aberrant crypt foci and prostaglandin E2 levels in rat colon." Carcinogenesis **20**(3): 425-30.

Litvak, D. A., B. M. Evers, et al. (1998). "Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21/waf1 /cip1 and p27/kip1." Surgery **124**: 161-70.

Lührs, H., J. Schaubert, et al. (1999). "Butyrate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B activation." Gastroenterology **116**(4): A563.

Marnett, L. J. (1992). "Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer." Cancer Res **52**(20): 5575-89.

Mayer, R. (1998). Gastrointestinal Tract Cancer. Harrison's Principles of Internal Medicine. Fauci AS, E. Braunwald, K. Isselbacher and et al. New York, McGraw-Hill: 568-592.

McDade, T. P., R. A. Perugini, et al. (1999). "Salicylates inhibit NF-kappaB activation and enhance TNF-alpha-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells." J Surg Res **83**(1): 56-61.

McIntyre, A., P. R. Gibson, et al. (1993). "Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model." Gut **34**(3): 386-91.

Medina, V., B. Edmonds, et al. (1997). "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 **57**: 3697-3707.

Miyashita, T. and J. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**: 293-299.

Morrison, R. and S. Farmer (1999). "Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(ink4c) and p21(waf1/cip1), during adipogenesis." J Biol Chem **274**(24): 17088-97.

Moss, S., B. Agarwal, et al. (1996). "Increased intestinal Bak expression results in apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **223**: 199-203.

Muir, K. and R. Logan (1999). "Aspirin, NSAIDs and colorectal cancer - what do the epidemiological studies show and what do they tell us about the modus operandi?" Apoptosis **4**: 389-96.

Nakano, K., T. Mizuno, et al. (1997). "Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line." J Biol Chem **272**(35): 22199-206.

Oltvai, Z., C. Milliman, et al. (1993). "bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**: 609-619.

Oshima, M., J. Dinchuck, et al. (1996). "Suppression of intestinal polyposis in APC 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (Cox-2)." Cell **87**: 803-9.

Pagano, M., A. Theodoras, et al. (1994). "Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts." Genes Dev **8**(14): 1627-39.

Palmer, D., C. Paraskeva, et al. (1997). "Modulation of p53 expression in cultured colonic adenoma cell lines by the naturally occurring luminal factors butyrate and deoxycholate." Int J Cancer **73**: 702-706.

Pasricha, P., A. Bedi, et al. (1995). "The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial adenomatous polyposis." Gastroenterology **109**: 994-998.

Piazza, G., A. Rahm, et al. (1997). "Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53-induction." Cancer Res **57**: 2452-59.

Piazza, G., A. Rahm, et al. (1995). "Antineoplastic drugs sulindac and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis." Cancer Res **55**: 3110-16.

Pugh, S. and G. Thomas (1994). "Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2." Gut **35**: 675-678.

Qiao, L., R. Hanif, et al. (1998). "Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells." Biochem Pharmacol **55**(1): 53-64.

Reddy, B., T. Kawamori, et al. (1999). "Chemopreventive efficiency of sulindac sulfone against colon cancer depends on the time of administration during carcinogenic process." Cancer Res **59**(14): 3387-91.

Reddy, B. S., C. V. Rao, et al. (1993). "Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats." Carcinogenesis **14**(8): 1493-7.

Reed, J. (1997). "Double identity for proteins of the Bcl-2 family." Nature **387**: 773-776.

Ricchi, P., S. Pignata, et al. (1997). "Effect of aspirin on cell proliferation and differentiation of colon adenocarcinoma Caco-2 cells." Int J Cancer **73**(6): 880-4.

Rickard, K., P. Gibson, et al. (1999). "Activation of protein kinase C augments butyrate-induced differentiation and turnover in human colonic epithelial cells *in vitro*." Carcinogenesis **20**(6): 977-984.

Rigas, B. and S. Shiff (1999). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the induction of apoptosis in colon cells: Evidence for PHS-dependent and PHS-independent mechanisms." Apoptosis **4**: 373-81.

Roediger, W. E. (1980). "Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man." Lancet **2**(8197): 712-5.

Roediger, W. E. (1982). "Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon." Cancer Res **42**(11): 4540-5.

Roediger, W. E. (1990). "The starved colon--diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis." Dis Colon Rectum **33**(10): 858-62.

Ruemmele, F. M., S. Dionne, et al. (1999). "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)." Cell Death Differ **6**(8): 729-35.

Sandler, R. (1996). "Epidemiology and risk factors for colorectal cancer." Gastroenterol Clin North Am **25**(4): 717-735.

Sarraf, P., E. Mueller, et al. (1998). "Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ ." Nature Med **4**(9): 1046-1052.

Scheppach, W. (1994). "Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function." Gut **35**(1 Suppl): S35-8.

Sherr, C. (1996). "Cancer cell cycles." Science **274**: 1672-1677.

Shiff, S. and B. Rigas (1997). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions." Gastroenterology **113**(6): 1992-1998.

Shiff, S. J., M. I. Koutsos, et al. (1996). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis." Exp Cell Res **222**(1): 179-88.

Shiff, S. J., L. Qiao, et al. (1995). "Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells." J Clin Invest **96**(1): 491-503.

Shpitz, B., Y. Bomstein, et al. (1997). "Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and, adenocarcinomas of the human colon." Am J Surg **174**: 425-30.

Siavoshian, S., H. M. Blottiere, et al. (1997). "Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **232**(1): 169-72.

Siavoshian, S., J. Segain, et al. (2000). "Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression." Gut **46**: 507-14.

Smith, W., R. Garavito, et al. (1996). "Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2." J Biol Chem **271**(52): 33157-60.

Souleimani, A. and C. Asselin (1993). "Regulation of C-fos expression by sodium butyrate in the human colon carcinoma cell line Caco-2." Biochem Biophys Res Commun **193**(1): 330-6.

Sovak, M., R. Bellas, et al. (1997). "Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer." J Clin Invest **100**: 2952-60.

Steinman, R., B. Hoffman, et al. (1994). "Induction of p21(waf-1/cip1) during differentiation." Oncogene **9**: 3389-3396.

Su, C., X. Wen, et al. (1999). "A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response." J Clin Invest **104**(4): 383-389.

Subbegowda, R. and T. Frommel (1998). "Aspirin toxicity for human colonic tumor cells results from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest." Cancer Res **58**: 2772-6.

Takayama, T., S. Katsuki, et al. (1998). "Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and carcinoma." N Engl J Med **339**(18): 1277-1284.

Thompson, M. A., M. A. Rosenthal, et al. (1998). "c-Myb down-regulation is associated with human colon cell differentiation, apoptosis, and decreased Bcl-2 expression." Cancer Res **58**(22): 5168-75.

Thornberry, N., Y. Lazebnik (1998). "Caspases: Enemies within." Science **281**:1312-16.

Tsujii, M., R. DuBois (1995). "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2." Cell **83**: 493-501.

Tsujii, M., S. Kawano, et al. (1997). "Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential." Proc Natl Acad Sci **94**: 3336-3340.

Vaziri, C., L. Stice, et al. (1998). "Butyrate-induced G1 arrest results from p21-independent disruption of Retinoblastoma protein-mediated signals." Cell Growth Differ **9**: 465-474.

Waga, S., G. Hannon, et al. (1994). "The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA." Nature **369**: 574-78.

- Wang, C., M. Mayo, et al. (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." Science **274**: 784-7.
- Wang, J. and E. Friedman (1998). "Short-chain fatty acids induce cell cycle inhibitors in colonocytes." Gastroenterology **114**: 940-6.
- Weaver, G. A., J. A. Krause, et al. (1988). "Short chain fatty acid distributions of enema samples from a sigmoidoscopy population: an association of high acetate and low butyrate ratios with adenomatous polyps and colon cancer." Gut **29**(11): 1539-43.
- Weber, F., Lührs, H., Krott, K., Schaubert, J. et al. Die Butyrat-vermittelte Modulation von Proliferation und Differenzierung von Kolonkarzinomzellen ist mit einer vermehrten Expression von PPAR γ assoziiert. Nutrition 2000, May 18 - 20, 2000, Vienna, Austria.
- Weinberg, R. (1997). The cell cycle clock and its control of cellular proliferation.
- Williams, C., W. Smalley, et al. (1997). "Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention." J Clin Invest **100**(6): 1325-1329.
- Xiong, Y., H. Zhang, et al. (1992). "D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA." Cell **71**: 505-14.
- Yamamoto, H., J. Soh, et al. (1999). "Comparative effects of overexpression of p27/kip1 and p21/Cip1/Waf1 on growth and differentiation in human colon cancer cells." Oncogene **18**: 103-115.
- Yamamoto, Y., M. J. Yin, et al. (1999). "Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway." J Biol Chem **274**(38): 27307-14.
- Yang, E. and S. Korsmeyer (1996). "Molecular Thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death." Blood **88**(2): 386-401.
- Zhang, W., L. Grasso, et al. (1995). "p53-independent induction of waf1/cip1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation." Cancer Res **55**: 668-74.
- Zhang, X., S. Morham, et al. (1999). "Malignant transformation and antineoplastic actions of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts." J Exp Med **190**(4): 451-9.

8 Danksagung

Ich bin allen jenen zu tiefstem Dank verpflichtet, die zum Gelingen dieser Dissertation in verschiedenster Weise beigetragen haben. Im besonderen möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach, Leiter des Schwerpunktes Gastroenterologie an der Medizinischen Klinik Würzburg, für die Möglichkeit in seinem Labor meine Promotionsarbeit durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. W. Timmermann, Chirurgische Universitätsklinik, Würzburg, für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. med. Thomas Menzel und Dr. med. Hardi Lührs, für die Betreuung während der Arbeit.

Frau Kerstin Backhaus, Elisabeth Kelber und Gerda Dusel für ihre Unterstützung während der Arbeit im Labor.

Herrn Dr. med. Martin Heuschmid für die freundliche Kritik des Manuskriptes.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

- Name Schauber
- Vorname Jürgen
- Geburtsdatum 6. Oktober 1973
- Geburtsort Laupheim

Schulbildung

- 1980-1984 Grundschule Ehingen
- 1984-1993 Gymnasium Ehingen

Hochschulbildung

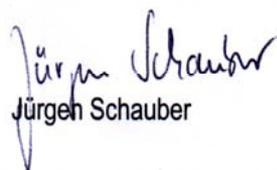
- WS1993-SS1996 Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
- WS1996-SS1997 Karolinska Institut, Stockholm, Schweden
- WS1997-SS1999 Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg

- September 1995 Ärztliche Vorprüfung
- August 1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- September 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- November 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

- Chirurgie Karolinska Institut, Stockholm, Schweden
- Innere Medizin Medizinische Klinik Würzburg und Inselspital Bern, Schweiz
- Radiologie Institut für Röntgendiagnostik, Universität Würzburg

Arzt im Praktikum seit Januar 2001, Medizinische Universitätsklinik
Würzburg, Schwerpunkt Gastroenterologie


Jürgen Schauber