

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Butyrateffekte auf die Adenom-Karzinom-Sequenz
beim Kolonkarzinom - HDGF („hepatoma derived growth factor“)**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Tilman Alexander Neun
aus Crailsheim**

Würzburg, Februar 2010

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Scheppach

Koreferent: Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 2010

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	
1.1	Epidemiologie	1
1.2	Ätiologie	3
1.3	Pathogenese	8
1.4	Tumorprogression und Angiogenese	10
1.5	Clusteranalyse	11
1.6	Ziele und Fragestellungen	13
2.	<u>Material und Methode</u>	
2.1	Zellen und Zellkulturversuche	14
2.2	RNA-Isolierung	14
2.3	cDNA-Array	15
2.4	Affymetrix® GenChip®-Array	17
2.5	Statistische Auswertung	19
2.6	Hierarchische Clusteranalyse	21
3.	<u>Ergebnisse</u>	
3.1	„spotted“-cDNA-Arrays	26
3.2	Clusteranalyse des „spotted“-cDNA-Arrays	30
3.3	Affymetrix® Genchip®	31
3.4	Clusteranalyse des Genchip®	33
3.5	Butyrat-regulierte Gene im HDGF-Cluster	34
3.6	Butyrat-regulierte Gene mit definierter Expression	36
4.	<u>Diskussion</u>	
4.1	Butyratregulierte Onkogene	39
4.2	Butyratregulierte Tumorsuppressorgene.	45
4.3	Das HDGF-Clusters	46
4.4	Weitere butyratregulierte Gene	48
4.5	Tabellarische Übersicht butyratregulierter Gene	49
4.6	Zusammenfassung	50

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Entwicklung der Inzidenz und Mortalität pro 100.000 Einwohner über die Jahre in Deutschland, dem Saarland und der ehemaligen DDR (Quelle: GEKiD, 2006)	1
Abb. 2	Gleichgewichtsreaktion zwischen Histonacetyltransferase (HAT) und Histondeacetylase (HDAC) an Lysingruppen der Histone (Quelle: Hildmann, 2004)	6
Abb. 3	Hemmung der Histondeacetylase durch Inhibitoren (hier zum Beispiel TSA) und Demethylierung von DNA führen zur Expression von Genen (Quelle: von Bock, 2005)	7
Abb. 4	Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms; Modell nach Vogelstein und Fearon, modifiziert nach Kullmann, 2003	9
Abb. 5	Beispiel für „Cluster“ aus der Biologie	11
Abb. 6	„Spotted Arrays“ (Knudsen, 2002)	17
Abb. 7	Herstellung eines Genchips® www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx	17
Abb. 8	Farbstoffmarkierung der RNA _{Total} und Hybridisierung www.affymetrix.com/technology/ge_analysis/index.affx	18
Abb. 9	Skalierung („Normalisierung“) basiert auf dieser Gleichung	19
Abb. 10	t-Test zur Untersuchung auf Signifikanz	20
Abb. 11	Abstand zweier Punkte im Koordinatensystem als Strecke	22
Abb. 12	Abstand zwischen zwei Punkten im Koordinatensystem, wobei N Zahl der Dimensionen, a und b zwei Objekte im Koordinatensystem	22
Abb. 13	Abstand zweier Punkte im Koordinatensystem als Vektorenwinkel durch den Ursprung	23
Abb. 14	Vektorwinkel, wobei N Zahl der Dimensionen, a und b zwei Objekte im Koordinatensystem sind	23
Abb. 15	Pearson Korrelationskoeffizient“, wobei N Zahl der Dimensionen, a und b zwei Objekte im Koordinatensystem sind	23
Abb. 16	Grad S der Korrelation zweier Gene (X,Y)	24
Abb. 17	Dendrogramm in „TreeView, Version 1.60“	25
Abb. 18	Expression des HDGF-Gens in Geki und HT29 ohne und nach Butyratinkubation	29
Abb. 19	Gencluster in Geki2 und HT29	30
Abb. 20	Clusteranalyse aller Gene für Geki 2 und HT 29	30
Abb. 21	Absolute Messwerte der Expression des HDGF-Gens in Geki, HT29 und SW620 ohne und nach Butyratinkubation (Identifikationsnummer 1499292)	32
Abb. 22	Absolute Messwerte der Expression des HDGF-Gens in Geki HT29 und SW620 ohne und nach Butyratinkubation (Identifikationsnummer 1491700)	32
Abb. 23	Dendrogramm der 8206 Gene (Ausschnitt)	33
Abb. 24	Clusteranalyse der Zelllinien Geki2, HT29 und SW620 nativ (Med) und nach Butyratinkubation (But) untereinander	33
Abb. 25	Butyrat-regulierte Gene (1. Teil) benachbert dem HDGF-Gen	34
Abb. 26	Butyrat-regulierte Gene (2. Teil) benachbert dem HDGF-Gen	35

Abb. 27	Butyrat-regulierte Gene mit einem Expressionsverhalten wie das von Tumorsuppressorgen	36
Abb. 28	Butyrat-regulierte Gene mit einem Expressionsverhalten wie das von Tumorsuppressorgen	37
Abb. 29	Weitere mögliche butyrat-regulierte Tumorsuppressorgene	38
Abb. 30	c-MYC und p53 (Max Planck Institut für Biochemie, 2007)	44

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Inzidenz und Mortalität pro 100.000 Einwohner nach Altersgruppen in Deutschland für Männer und Frauen (Quelle: GEKiD, 2006)	2
Tab. 2	Verwendete Zelllinien, histologische Typen und deren Hersteller	14
Tab. 3	PCR: Zyklen mit Temperatur und Dauer	16
Tab. 4	Relative Genexpression in Geki ohne (Geki/SH Med) und nach Butyratinkubation (Geki/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med).	26
Tab. 5	Relative Genexpression in Geki ohne (Geki/SH Med) und nach Butyratinkubation (Geki/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med.).	27
Tab. 6	Relative Genexpression in HT29 ohne (HT29/SH Med) und nach Butyratinkubation (HT29/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med.)	28
Tab. 7	Relative Genexpression in HT29 ohne (HT29/SH Med) und nach Butyratinkubation (HT29/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med.)	28
Tab. 8	Relative Genexpression in Geki und HT29 ohne (Tumori/SH Med) und nach Butyratinkubation (Tumor/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med.)	29
Tab. 9	Expression des HDGF-Gens in den einzelnen Zellkulturen, gemessen auf zwei getrennten Detektionsfeldern	31
Tab. 10	Überblick: Butyrateffektes auf die Genexpression von HDGF in den einzelnen Zellkulturen	31
Tab. 11	Zusammenfassung: Butyrateffekte, Gene und Pathophysiologie des Kolon-Ca	50

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom

1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom tritt mit einer Inzidenz von 30-35/100.000 Einwohnern in Deutschland auf. Damit zählt sie in Europa zu den höchsten. Seit den 70er Jahren ist sie weiter zunehmend (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland und Robert-Koch-Institut Berlin, 2006).

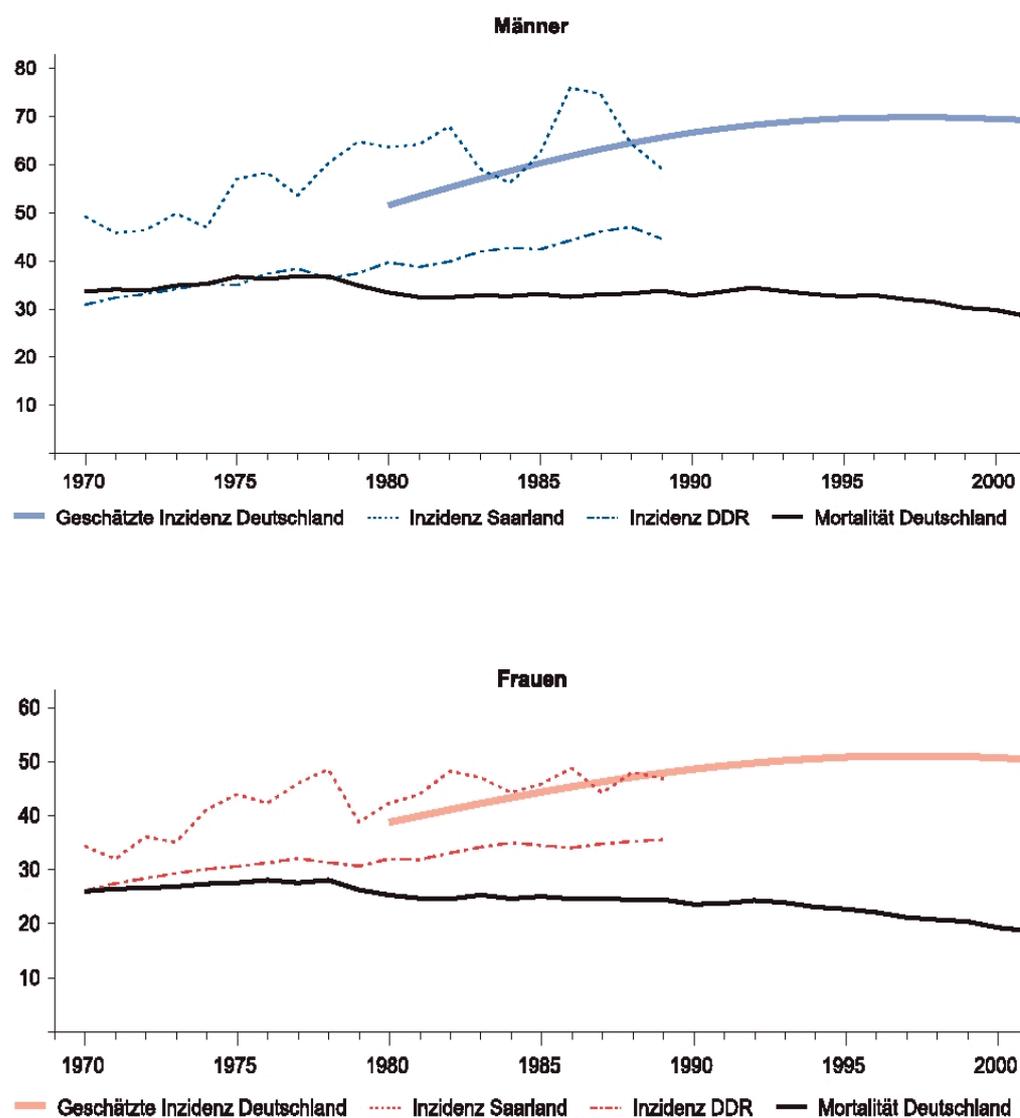


Abb. 1 Entwicklung der Inzidenz und Mortalität pro 100.000 Einwohner über die Jahre in Deutschland, dem Saarland und der ehemaligen DDR (Quelle: GEKiD, 2006)

Jährlich sterben mehr als 20.000 Patienten an den Folgen des kolorektalen Karzinoms. Es ist die, nach dem Bronchialkarzinom, zweithäufigste zum Tode führende Krebserkrankung des Mannes und nach Brustdrüsenkrebs die zweithäufigste der Frau (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2005). Das Manifestationsalter beträgt bei Männern im Mittel 69 Jahre, bei Frauen 75 Jahre (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland und Robert-Koch-Institut Berlin, 2006). Für 25 % der Erkrankten können prädisponierende Faktoren eruiert werden. Dies sind kolorektale Adenome, Verwandtschaft ersten Grades zu einem an Darmkrebs Erkrankten, Colitis ulcerosa und andere chronisch-entzündliche Darmkrankheiten, das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC, Lynch-Syndrom) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Letztere führt mit einer Wahrscheinlichkeit von annähernd 100 % zur Erkrankung (Classen et al, 2004).

Alter	Männer		Frauen	
	Inzidenz	Mortalität	Inzidenz	Mortalität
unter 45	4,3	1,0	4,0	0,8
45 bis 59	69,1	20,5	52,4	12,9
60 bis 74	300,3	103,0	175,5	56,1
über 75	501,3	286,5	423,8	225,2

Tab. 1 *Inzidenz und Mortalität pro 100.000 Einwohner nach Altersgruppen in Deutschland für Männer und Frauen (Quelle: GEKiD, 2006)*

1.2 Ätiologie

Von den wesentlich häufigeren sporadischen Fällen eines kolorektalen Karzinoms, sind Formen mit definierter Ätiologie abzugrenzen, so zum Beispiel die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC, Lynch-Syndrom). Für diese Erkrankungen konnten bestimmte Genmutationen identifiziert werden. Mehrere Studien weisen bei der Entwicklung eines sporadischen kolorektalen Karzinoms, neben einer genetischen Prädisposition, auf den Einfluss exogener Risikofaktoren hin.

Ernährungsfaktoren

In prospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass hoher Fleischkonsum – dagegen nicht der von Geflügel und Fisch – mit einem erhöhtem Erkrankungsrisiko einhergeht (Willett et al., 1990). Dazu wurden 150 Patientinnen untersucht, welche an einem kolorektalen Karzinom erkrankten („Nurses Health Study“). In den darauffolgenden Jahren konnten Metaanalysen mehrerer klinischer und experimenteller Studien diese Beobachtungen teilweise bestätigen (Sandhu et al., 2001 und Norat et al., 2002) oder nicht bestätigen (Flood et al., 2003). In einer weiteren Analyse wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ernährung und Erkrankung ausschließlich für weiterverarbeitete Fleischprodukte, dagegen nicht für unverarbeitetes Rinder-, Lamm- oder Schweinefleisch, festgestellt (Wei et al., 2004). Bei der Untersuchung präventiver Eigenschaften einer fischreichen Ernährung, konnte nur eine geringe, für Geflügelfleisch keine Korrelation beobachtet werden (Norat et al., 2002). Im Jahre 2005 wurde eine der größten Kohortenstudien unter Männern und Frauen veröffentlicht, die erneut den Zusammenhang zwischen Ernährung und dem Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, untersuchte. Dabei wurde eine signifikante Assoziation festgestellt. Das absolute Risiko eines 50jährigen, innerhalb von zehn Jahren zu erkranken, betrug 1,71% in der Gruppe mit dem höchstem und 1,28% in der Gruppe mit dem geringsten Fleischkonsum. Entsprechend sank das Risiko von 1,86% in der Gruppe mit dem geringsten Konsum an Fisch, auf 1,28% in der mit dem höchsten. Hoher Konsum von Geflügelfleisch wirkte sich nicht auf die Inzidenz aus (Norat et al., 2005).

Der zugrundeliegende biochemische Mechanismus ist bislang im Detail ungeklärt. Womöglich liegt diesem eine endogene Nitrierung zugrunde, die bei Verdauung des Hämoglobin-Eisen-Komplexes aus Schweine-, Rinder- und Lammfleisch stattfindet (Bingham et al., 2002 und Cross et al., 2003). Die Tatsache, dass regelmäßiger Verzehr verarbeiteten Fleisches mit einem höheren Erkrankungsrisiko, als dem unverarbeiteten, einhergeht, könnte auf Verarbeitungsprozesse oder Nahrungsmittelzusätze zurückzuführen sein (Linseisen, 2002). Die Rolle von heterozyklischen Aminen (zum Beispiel Nitrosaminen) und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen werden bislang kontrovers diskutiert. Sie entstehen beim Kochen, Braten oder Frittieren der Nahrung. Ein genetischer Polymorphismus bei der Metabolisierung dieser möglichen Karzinogene ist bekannt und könnte zur genetischen Prädisposition dieser Erkrankung beitragen (Sugimura, 2000). Verantwortliches Enzymsystem in diesem Metabolismus ist die Unterklasse 2C9 des Cytochrom P450, welche im Intestinaltrakt exprimiert wird und für welche ein genetischer Polymorphismus existiert. Eine hohe Enzymaktivität dieses Systems geht mit einem höheren Erkrankungsrisiko einher (Martinez et al., 2001).

Die 2003 publizierte prospektive Kohorten-Studie EPIC („European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition“) untersuchte im Gegenzug den Einfluss ballaststoffreicher Ernährung auf die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms. Aus zehn europäischen Ländern nahmen etwa 520.000 Probanden zwischen 25 und 70 Jahren an dieser Studie teil. Es konnte gezeigt werden, dass das relative Risiko in Populationen mit ballaststoffarmer Ernährung, durch Umstellung auf eine ballaststoffreiche, um ungefähr 40% gesenkt werden kann. Eine 2005 in den Vereinigten Staaten veröffentlichte Analyse prospektiver Kohorten-Studien, stellte gleichermaßen eine umgekehrt proportionale Korrelation zwischen ballaststoffreicher Ernährung und Erkrankung fest. Dagegen konnte nach Abzug der anderen Ernährungsfaktoren – zum Beispiel Anteil des Fleischkonsums –, keine signifikante Assoziation mehr errechnet werden (Park et al., 2005). Ein möglicher Grund für die präventiven Eigenschaften der Ballaststoffe, ist die Beschleunigung der Darmpassage und die damit verbundene Verkürzung der Kontaktzeit karzinogener Verdauungsbestandteile mit der Schleimhaut des Darmes. Ein weiteres Erklärungsmodell beruht auf der Fermentierung nichtverdaulicher Ballaststoffe durch die mikrobielle Darmflora, bei der die kurzkettigen Fettsäuren Butyrat, Propionat und Acetat entstehen.

Für diese werden unter anderem antiproliferative, differenzierungs- und apoptoseinduzierende, sowie antiinflammatorische Effekte berichtet (siehe unten). Weiter werden NSARs, zum Beispiel der Acetylsalicylsäure, eine präventive Wirkung zugesprochen (Menzel et al., 2002). Womöglich reduzieren auch Folsäure, Methionin, Vitamin B6, Vitamin B12, Selen und die Vitamine E und C das Erkrankungsrisiko (Kune und Watson, 2006).

Effekte kurzkettiger Fettsäuren auf Epithelzellen der Kolonmukosa

Die kurzkettigen Fettsäuren Butyrat, Propionat und Acetat entstehen bei der Fermentierung von Ballaststoffen durch die mikrobielle Flora des Kolons (Kritchevsky, 1995). Sie dienen den Mukosaepithelzellen als Energieträger (Scheppach, 1995) und vermitteln verschiedenste Effekte mit Auswirkung auf den gesamten Organismus. In Zellkulturexperimenten konnten zellteilungshemmende, differenzierungs- und apoptose-induzierende Effekte auf Zellen in Transformation gezeigt werden (Hague et al., 1996). Induktion von Apoptose geschieht durch Butyrat - unabhängig von p53 - und wurde auch in-vivo beobachtet (Tsujii, 1995). Seit langem bekannt sind die präventiven Eigenschaften der kurzkettigen Fettsäure Butyrat für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms (Russo et al., 1999). Neue Aspekte zum Verständnis dessen molekularer Effekte werden in dieser Arbeit untersucht und diskutiert. Neben Proliferationshemmung werden den kurzkettigen Fettsäuren antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben. Eine ballaststoffreiche Ernährung und kurzkettige Fettsäuren können womöglich in der Prävention und Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt werden (Galvez et al., 2005). Als Vermittler dieser Entzündungshemmung konnten unter anderem sogenannte Kathelizidine identifiziert werden, deren Synthese in verschiedensten Zellen durch kurzkettige Fettsäuren angekurbelt werden (Schauber et al., 2003).

Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression an bestimmten Promotorregionen. Eine mögliche Butyratwirkung ist der modulierende Einfluss auf die DNA-Chromatinstrukturierung. In vielen Zellexperimenten konnten tatsächlich eine Induktion der Histonacetylierung und Hemmung der Deacetylierung beobachtet werden (Sealy et al., 1978 und Aviram et al., 1994).

Siavoshian et al. verglichen die Effekte der zwei Histondeacetylase-Inhibitoren Butyrat und Trichostatin A (TSA) auf Proliferation und Zelldifferenzierung. Sie stellten Unterschiede in der Wirkung dieser beiden Inhibitoren fest, die nicht ausschließlich auf deren unterschiedlichen Halbwertszeit beruhten. Butyrat blockierte den Zellzyklus in der G1-Phase, während TSA dies in der G1- und G2-Phase tat. Auch unterschieden sich deren Wirkungen auf die Zykline D1 und D3. Beide erhöhten die Expression des p21-Genes. Daneben stimulierte Butyrat die Alkalische Phosphatase und Dipeptidyl Peptidase IV, auf die TSA keinen Einfluss nahm. Daraus lässt sich schließen, dass Butyrat nicht ausschließlich die Transkription reguliert (Siavoshian et al., 2000). Histondeacetylase deacetylieren Lysine an den N-terminalen Enden der Histone. Je zwei Histone der Typen 2A, 2B, 3 und 4 bilden die sogenannten Nucleosomen, um die sich die genomische DNA wickelt. Sie sind die Trägerstruktur des Chromatins (Hayes et al., 2001). Im unacetylierten Zustand weisen die Histone an ihren Lysinresten positive Ladungen auf, welche DNA binden. Durch Acetylierung werden diese Ladungen aufgehoben und die DNA-Bindungsfähigkeit reduziert, wodurch sich die Chromatinstruktur auflockert. Dadurch wird die Transkription und infolge Expression bestimmter Gene ermöglicht. Gegenspieler der Histondeacetylase (HDAC) sind die Histonacetyltransferase (HAT), welche zusammen im Gleichgewicht ein bestimmtes Acetylierungsniveau aufrechterhalten (Katan-Khaykovich und Struhl, 2002). Dies moduliert neben anderen Mechanismen die Transkription von Genen.

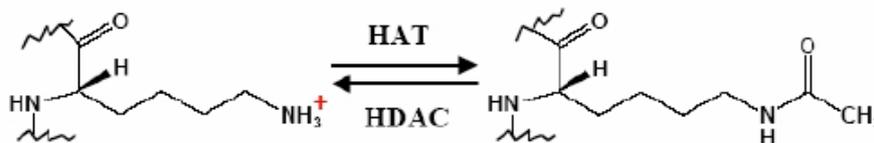


Abb. 2 Gleichgewichtsreaktion zwischen Histonacetyltransferase (HAT) und Histondeacetylase (HDAC) an Lysinresten der Histone (Quelle: Hildmann, 2004)

Butyrat und andere Inhibitoren der Histondeacetylasen wie Trichostatin A (TSA) verschieben dieses Gleichgewicht zugunsten Transkription bestimmter Gene:

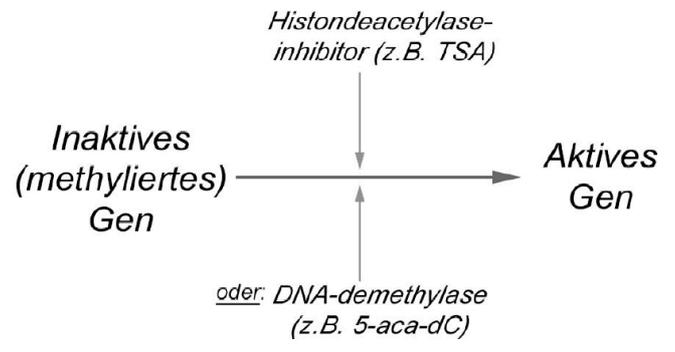


Abb. 3 Hemmung der Histondeacetylase durch Inhibitoren (hier zum Beispiel TSA) und Demethylierung von DNA führen zur Expression von Genen (Quelle: von Bock, 2005)

Andere Mechanismen der Transkriptionsregulation stellen zum Beispiel die Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinierung an Histonen oder die DNA-Methylierung dar (Turner, 2002). Auch durch Butyrat wird eine Modulation der Histonphosphorylierung (Boffa et al., 1981) und der DNA-Methylierung (De Haan et al., 1986) beschrieben. Es besteht ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Chromatinstrukturierung. Die Verbindung beider Regulationssysteme ist ein Multiproteinkomplex, in welchem dem Protein MeCP2 eine zentrale Bedeutung zukommt. Die DNA-Methylierungsmuster entstehen meist bereits in frühembryonalen Zellen. Dabei ist dieses epigenetische Muster ein „Fußabdruck“ der embryonalen Promotoraktivität, da Transkriptionsaktivität eine Methylierung verhindert (Nikitina et al., 2007).

Weitere Risikofaktoren

Adipositas und Bewegungsarmut galten bislang als weitere Risikofaktoren. Jedoch konnte in einer prospektiven Kohortenstudie unter Frauen, die Hypothese, körperliche Aktivität reduziere die Inzidenz, nicht gestützt werden (Calton et al., 2006). Hoher Alkoholkonsum (Moskal et al., 2007) und Rauchen (Kim et al., 2006) erhöhen dagegen das Risiko einer Erkrankung. Durch Umstellung von Lebensgewohnheiten und der Ernährung ließen sich annähernd 70% aller Erkrankungsfälle der westlichen Welt vermeiden (Willett, 2002).

1.3 Pathogenese

In den meisten Fällen entwickelt sich das Karzinom auf dem Boden von Adenomen. Diese finden sich bei etwa 20 % der über 60-jährigen. Sie manifestieren sich als Polypen. Man unterscheidet drei Typen von Adenomen, ein tubuläres, ein villöses und ein tubulo-villöses. Abhängig von Größe und Typ des Adenoms besteht ein hohes Risiko einer maligne Transformation. Das Risiko ist bei großen villösen Adenomen am höchsten. Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung Colitis ulcerosa neigt zur Entwicklung von Epitheldysplasien ohne typisches Adenomstadium. Ansonsten treten 90 % der Epitheldysplasien als Adenom auf. Der Übergang vom Adenom zum Karzinom wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet. Im Adenomstadium kann der Patient durch Abtragen des Adenoms vollständig geheilt werden. Der relativ langsame Übergang vom Adenom zum Karzinom ermöglicht eine effektive Vorsorge durch regelmäßige Koloskopien (Classen et al., 2004).

Als Begründer des Konzeptes einer Adenom-Karzinom-Sequenz gilt der amerikanische Arzt Bert Vogelstein. Der Übergang von gesundem Schleimhautepithel über das Adenom zum Karzinom und zur Metastase ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen. Das Modell der Karzinogenese nach Vogelstein und Fearon beruht auf der Annahme, dass Tumorsuppressorgene nach Mutation eines Alleles und Verlust des zweiten („loss of heterozygosity“, LOH) nicht mehr exprimiert und dadurch inaktiviert werden (Chromosomeninstabilität). Daneben werden bislang ruhende Onkogene durch den Wegfall hemmender Faktoren exprimiert. Beide stören das Gleichgewicht aus Proliferation und programmierten Zelltod zugunsten einer malignen Transformation. Für das kolorektale Karzinom ist die sequentielle Abfolge genetischer Veränderungen bekannt: Am Anfang steht die LOH des APC-Gens. Es werden verschiedene Stadien einer Adenomentwicklung eingeleitet. Das Onkogen k-ras wird exprimiert, die Tumorsuppressorgene SMAD2 und 4 sowie DCC werden inaktiviert. Mit Verlust des zweiten intakten Alleles des p53 (Apoptose) ist die maligne Transformation zum Karzinom vorangeschritten (Vogelstein et al., 1988; modifiziert nach Kullmann, 2003).

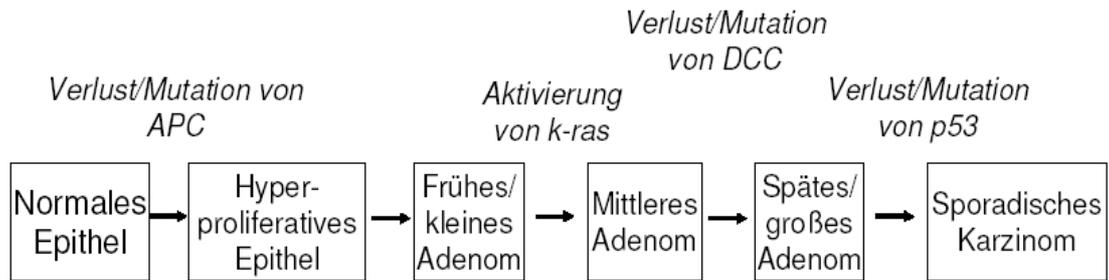


Abb. 4 Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms; Modell nach Vogelstein und Fearon, modifiziert nach Kullmann, 2003

Neben diesen grundlegenden genetischen Veränderungen, wird die Tumorgenese durch eine Vielzahl extrinsischer und intrinsischer Faktoren moduliert. Es existieren parallele Signaltransduktionswege, welche para- und autokrine Wirkungen einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren vermitteln. Sie sind auch an der Regulation der Angiogenese und dem Verlust der Zelladhäsionsmechanismen beteiligt.

Patienten mit einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP) besitzen einen hereditären Defekt des APC-Gens. Daher ist ihr Risiko für einen Verlust des zweiten heterozygoten Genes besonders hoch. Ihr Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt ohne Überwachung und schließlich präventive Operation fast 100%. Beim hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC, Lynch-Syndrom) werden Veränderungen von Mismatch-Repair-Genen durch sogenannte Mikrosatelliteninstabilität beobachtet, welche die Entstehung des Karzinoms auf anderem Wege induzieren (Classen et al., 2004).

1.4 Tumorprogression und Angiogenese

Die Extension des Tumors geht mit einer Reihe von Reaktionen des Bindegewebes einher, welche als „umgebende Stroma-Reaktion“ bezeichnet werden. Vermittelt werden diese durch verschiedene Zytokine. Unter anderem wird die Neubildung von Gefäßen induziert. Ab einer bestimmten Größe des Tumors wird ausschließliche Diffusion zur Ernährung des Tumors insuffizient und neugebildete Gefäße müssen die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherstellen. Dieser Vorgang wird als Angiogenese bezeichnet. Stimulierende Reize, welche zur Sekretion solcher Wachstumsfaktoren führen, sind Hypoxie und Kompression des Tumors (Mukhopadhyay, 1995). Beteiligte Wachstumsfaktoren sind VEGF, bFGF, PDGF, Interleukin 1, -6, und -8, welche para- und autokrin wirksam sind (Sunderkotter, 1994). Diese Mechanismen sind essentiell für die Progression des malignen Tumorleidens. Sie bieten daher spezifische therapeutische Ansatzpunkte. Ziel ist es, Signaltransduktionswege in den malignen Zellen zu beeinflussen und neben direkten Effekten auf die Zellen, diese durch inadäquate vaskuläre Versorgung „auszuhungern“.

1.5 Cluster-Analyse

Durch die Verwendung von Arrays zur Expressionsanalyse lassen sich schnell und komfortabel Profile tausender Gene erstellen. Diese ermöglichen eine Untersuchung zellulärer Regulationsmechanismen auf molekularbiologischer Ebene. Der immense Datenanfall und die damit verbundenen Schwierigkeiten der Organisation und Visualisierung der gewonnenen Daten lassen sich mit gewöhnlichen Auswertungsmethoden nur schlecht bewerkstelligen. Eine Lösung bieten Clusteranalysen. Diese sind ein geeignetes Mittel zur Sortierung von Microarray-Daten (Eisen et al., 1998).

Der Begriff „Cluster“, aus dem Englischen für „Haufen“ oder „Gruppe“, wurde 1939 erstmals von Tryon verwendet. Er beschreibt das Kategorisieren von Objekten ähnlicher Art in gemeinsame Gruppen, in dem die Objekte innerhalb einer solchen Gruppe am stärksten miteinander, zu benachbarten Gruppen noch stark, zu weiter Entfernten aber zunehmend weniger assoziiert sind. Dabei ist die Cluster-Analyse eine Methode, Daten zu strukturieren, trifft aber weder eine Aussage zu Ursache oder statistischen Signifikanz der Assoziation. Cluster begegnen uns in vielen Bereichen der Wissenschaft, unter anderem der Biologie. Beispielhaft bildet der anthropologische Stammbaum folgende Cluster: Die Menschen gehören in die Gruppe der Primaten, diese zu den Säugetieren, diese wiederum zu den Wirbeltieren und schließlich zu den Lebewesen. Die Affen befinden sich mit den Menschen im gleichen Cluster der „Primaten“. Beide sind anthropologisch stärker assoziiert als – zum Beispiel – mit Hunden, mit denen sie sich nur im übergeordneten Cluster der „Säugetiere“ befinden. Je übergeordneter ein gemeinsames Cluster, desto weitreichender werden die Einschlusskriterien gewählt.

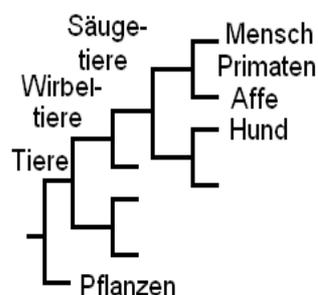


Abb. 5 Beispiel für „Cluster“ aus der Biologie

In der experimentellen Forschung finden Cluster-Analysen vor allem bei der Expressionsanalyse von Genen Verwendung. Sie ermöglichen das Auffinden von ähnlich regulierten Genen. Die Cluster-Analyse setzt voraus, dass Kriterien definiert werden, die eine Sortierung der Objekte ermöglichen. Meist sind dies Expressionsmesswerte (Knudsen, 2002).

Gene mit ähnlichem Expressionsprofil werden zu Gruppen, sogenannten „Clustern“ zusammengefasst. Auf einen Blick lassen sich korrelierende Gene identifizieren. Grundlage dieser statistischen Methode ist das „hierarchische Clustern“ der Daten mit der „average-linkage Clusteranalyse“, die sich besonders für die Betrachtung biologischer Systeme eignet (Sokal et al., 1958). Damit können nicht nur korrelierende Gene detektiert, sondern auch verschiedene Gewebe nach ihren Expressionsprofilen sortiert werden. Zum Beispiel lassen sich so Tumor- von Normalgewebe oder verschiedenen Tumorentitäten voneinander unterscheiden, auch bei nur geringfügig abweichenden Expressionswerten (Alon et al., 1999). Tumorgewebe eines Kolonkarzinoms des rechtsseitigen Colons kann so, zum Beispiel, von dem des linksseitigen oder lymphknotenpositive Stadien von lymphknotennegativen unterschieden werden (Zou et al., 2002).

1.6 Ziele und Fragestellungen

Präklinische und klinische Studien weisen auf günstige Effekte der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auf Inzidenz und Progression des kolorektalen Karzinoms hin. Obwohl die Butyratwirkung auf die Expression verschiedener Gene bereits gezeigt wurde, ist wenig bekannt über die Expressionmodulation während der Adenom-Karzinom-Sequenz und der weiteren Tumorprogression. Grundlage dieser Arbeit sind Zellkulturexperimente. Es sollen Zellen normaler Dickdarmschleimhaut, eines Adenoms (Geki2), Karzinoms (HT29) sowie einer Metastase (SW620) untersucht werden. Mit den einzelnen Zelllinien können verschiedene Phasen der Tumorgenese und Progression des Kolonkarzinoms im Modell nachgestellt werden. Für jede Phase wird eine umfangreiche Analyse der Genexpression erfolgen. Es sollen mögliche butyrat-regulierte Onkogene und Tumorsuppressorgene identifiziert und deren wahrscheinliche oder mögliche Funktionen diskutiert werden.

2. Material und Methode

2.1 Zellen und Zellkulturversuche

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Histologischer Typ	Hersteller
Geki2	Adenom	Menzel, Melcher et al., 2004 Gastroenterologie Universitätsklinikum Würzburg
HT29	Karzinom	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA ATCC-Nr. HTB-38D
SW620	Metastase	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA ATCC-Nr. CCL-227

Tab. 2 *Verwendete Zelllinien, histologische Typen und deren Hersteller*

Zellkulturversuche

Die Aussaat fand jeweils in 25cm² Kulturflaschen statt. Als Kulturmedium dienten RPMI (Life Technologies, Paisley, UK) mit 10% FBS und DMEM (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10%FBS. Die Umgebungsbedingungen wurden auf 37°C und einem CO₂-Luftgehalt von 5% konstant gehalten.

Jede Zelllinie wurde mit 4mM Butyrat inkubiert. Eine zweite Kultur diente jeweils als Mediumkontrolle. Alle Kulturen – einschließlich der Kontrollen – wurden mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Jeder Ansatz wurde nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden geerntet.

2.2 RNA-Isolierung

Es wurde nach dem TriFast-Protokoll PegGold-Lab des Herstellers gearbeitet. Nach Absaugen des Nährmediums erfolgte die Lysierung der Zellen mit 1ml TriFast[®] (Peqlab, Erlangen) innerhalb der Zellkulturflaschen. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Im nächsten Schritt wurde nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur 200µl Chloroform zugegeben und kräftig geschüttelt. Erneut wurde 10 Minuten inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte

nach Zentrifugation mit 13 000rpm für 5 Minuten. Die oberste Phase wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Sie enthielt zu einem großen Anteil die Gesamte-RNA der lysierten Zellen. Die abgetrennte Phase wurde mit 0,5ml Isopropanol (Sigma-Aldrich) versetzt, vortexiert und für 15 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation mit 13.000rpm für 10 Minuten bei +4°C lag die RNA als Präzipitat vor. Der Isopropanolüberschuss wurde abgegossen und das Präzipitat zweimal mit 1ml 75%igen Ethanol gewaschen. Dazu wurde es zweimal 10 Minuten lang mit 13.000rpm bei +4°C zentrifugiert. Das nun am Boden des Eppendorfgefäßes befindliche RNA-Pellet wurde, nach kurzem Trocknen an der Luft, in 100µl DEPC-Wasser gelöst. Lagerung fand bei -80°C statt.

2.3 cDNA-Array

Die umfangreichen Expressionsanalysen dieser Arbeit wurden erst durch die Verwendung sogenannter Microarrays möglich. Es kamen ein „spotted cDNA-Array“ und ein „GenChip“-Array der Firma Affymetrix® zur Anwendung. Beide Analysen wurden freundlicherweise am Institut für Pathologie der Universität Würzburg vorbereitet und durchgeführt.

Unsere Expressionsanalysen aus dem Jahr 2003 erfolgten mit Hilfe sogenannter „spotted“ Glas-Arrays. Ein automatisierte Roboterarm, der „Spotter“, verteilt kleinste Proben gelöster cDNA von Mikrotitrierplatten auf Glasplättchen. Die Proben sind komplementär zu dem Gen, welches detektiert werden soll. Sie sind an bestimmter Stelle als Streifen auf dem Glasplättchen fixiert. 12.000 bekannte Gene wurden untersucht.

Herstellung des Arrays

Die Detektions-cDNA/Oligomere entstammten dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD), Berlin. 3µl dieser Lösung wurden in einem PCR-Reaktionsgemisch angesetzt, bestehend aus 3U (Units) Taq-DNA-Polymerase, 1,5mM MgCl₂, 10x PCR-Puffer, 10µM *5'-Primer, 10µM *3'-Primer, 2µM dNTP und 1,3M Betain. Es wurde 1,3% DMSO zugesetzt. Die PCR fand in einem Thermocycler statt.

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	96°C	2min.
40	93°C	30sek.
	60°C	40sek.
	72°C	2min.
1	72°C	5min.

Tab. 3 PCR: Zyklen mit Temperatur und Dauer

Synthese von cDNA aus RNA_{total} und deren Farbmarkierung

Es wurde ein Cyscribe First-Strand cDNA Labelling Kit® (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) verwendet. Der Ansatz für das Primer-Annealing wurde hergestellt aus: 15µg RNA_{total}, 1µg Random-Primer und 1µg dT-Primer für jede RNA-Probe. Der Master-Mix enthielt 4µg 5xCyScript-Puffer, 2µg 0,1M DTT, 1µg dNTP, 1µg CyDye-farbstoffmarkiertes dCTP und 1µg CyScript-Reverse Transkriptase.

Hybridisierung

Die mit Cy3- und Cy5-farbstoffmarkierten cDNA-Proben wurden in ein Gefäß zusammengebracht. Durch getrennte Bestimmung der Expression mit Cy3- und Cy5-Farbfilttern, konnten beide Experimente im Duplexverfahren parallel gemessen werden. Eine Pre-Hybridisierungslösung wurde hergestellt aus 36,75ml 25%-ig Formalin, 18,75ml 5x SSC in 18,75ml 0,1%-ig SDS und 0,75g 1%-ig BSA. Diese wurde unter ständigem Rühren auf 45-50°C erwärmt. Die Glasplättchen wurden für 45 Minuten in den 42°C warmen Pre-Hybridisierungs-Puffer eingetaucht. Die Probenlösung wurde an der Kante des Deckgläschens luftblasenfrei aufgebracht, so dass die Lösung diese unterspülte. Diese wurden 12 bis 18 Stunden im 42°C warmen Wasserbad belassen.

Abspülen nicht-hybridisierter cDNA

Nach Entfernen des Deckgläschens wurde der Array in 2x SSC mit 0,1% SDS fünf Minuten bei 42°C und in 0,1x SSC mit 0,1% SDS zehn Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde das Glasplättchen viermal für eine Minute in 0,1x SSC gelegt. Nach Abspülen mit H₂O und 100%-igem Ethanol wurden diese bei weniger 800rpm zentrifugiert, bis sie getrocknet waren.

Scannen des cDNA-Microarrays

Es kam der Scanner ScanArray 4000® der Firma Perkin Elmer zum Einsatz. Dieser wurde durch die Software QuantArray® gesteuert. Die anschließende Analyse der generierten Messdaten erfolgte mit ScanAnalyze von Mike Eisen, Stanford.

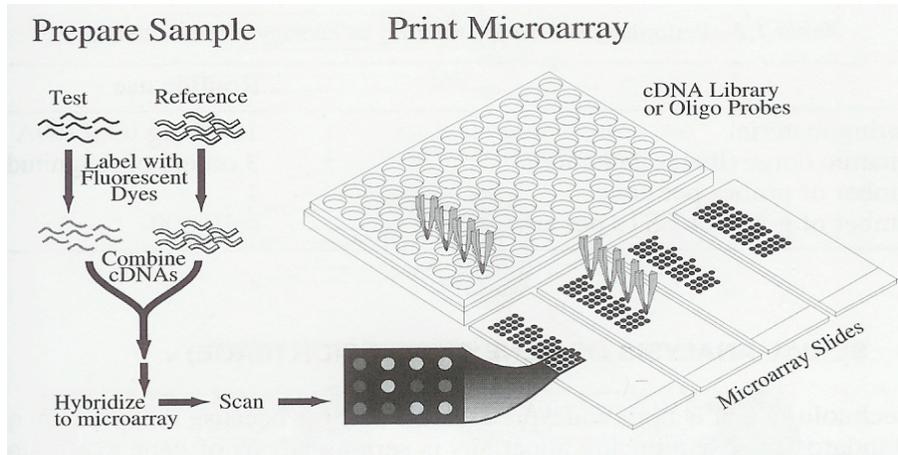


Abb. 6 „Spotted Arrays“ (Knudsen, 2002)

2.4 Affymetrix® GenChip®-Array

Die Zellkulturversuche aus 2005 wurden mit einem GenChip® der Firma Affymetrix analysiert. Dieser besteht aus Oligonukleotiden, welche auf bestimmten Stellen des quarzbeschichteten Chips synthetisiert worden sind. Die Synthese der aus bis zu 25 Nukleotiden bestehenden Oligomeren geschieht mit einem photolithographischen Verfahren, ähnlich der Chipherstellung eines Computers.

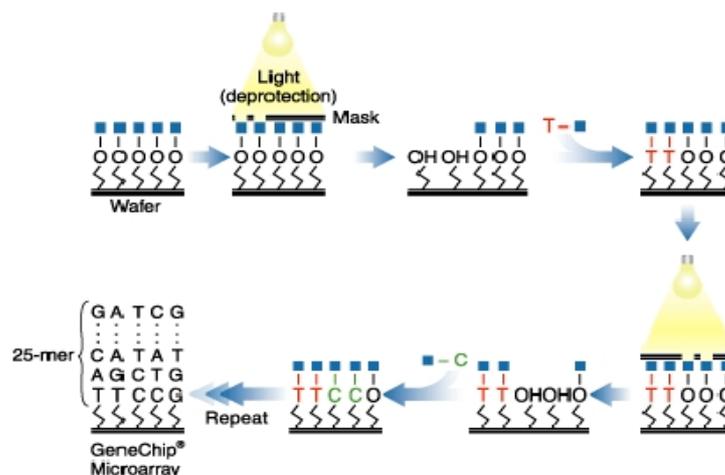


Abb. 7 Herstellung eines Genchips®

(Quelle: <http://www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx>)

Jeweils mehrere Oligonukleotide detektieren ein Gen. Dabei wird eine Region des Genes gewählt, die am wenigsten Ähnlichkeit zu solchen anderer Gene aufweist. Elf bis 20 der Oligonukleotide stimmen genau mit der Region überein, also sind perfekt komplementär („Perfect Matches“, PM). Daneben sind elf bis 20 Oligonukleotide aufgebracht, welche bis auf die Position 13 mit den anderen Oligomeren übereinstimmen. Diese hybridisieren nicht mit der zu detektierenden Region, sondern sollen unspezifische Hybridisierung quantifizierbar machen („Mismatch“, MM). Vor Hybridisierung des GenChip® wird die gewonnene cDNA in Anwesenheit von biotin-UTP und biotin-CTP mit RNA-Polymerase zu 50 bis 100 mal mehr cRNA-Kopien amplifiziert. Diese biotin-markierte cRNA wird bei 94°C zu cRNA-Fragmenten mit einer Länge von 35 bis 200 Nukleotiden denaturiert. Nach Hybridisierung wird das nicht gebundene Material abgewaschen. Dem Chip wird Streptavidin-Phycoerythrin zugesetzt, das mit der biotin-markierte cRNA bindet. Nach erneutem Waschen wird der Chip im konfokalen Laserlicht gescannt und das Bild im Rechner analysiert. (Knudsen, 2002).

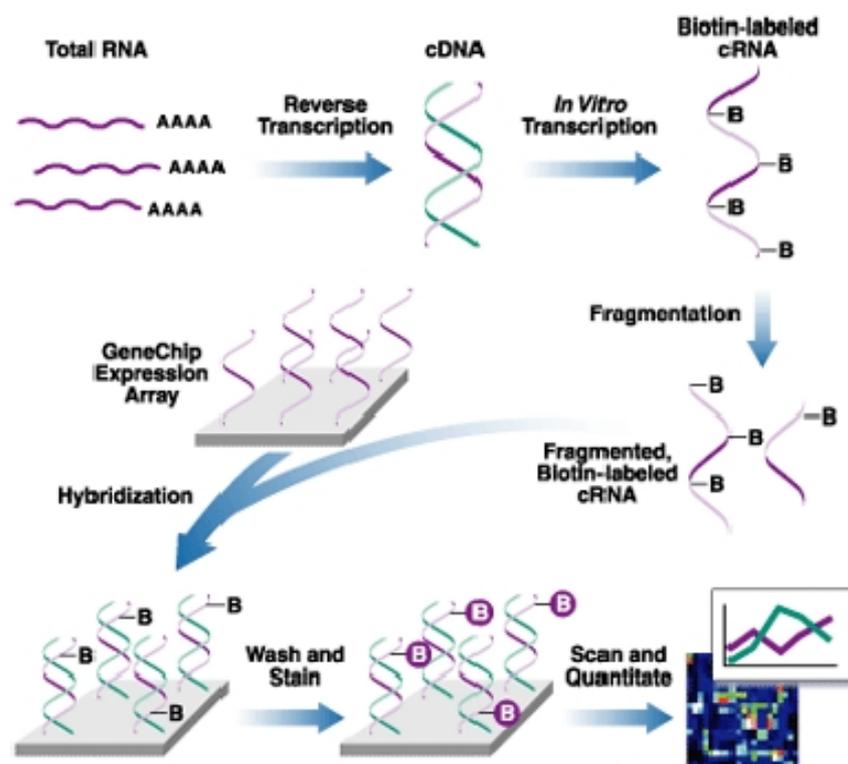


Abb. 8 Farbstoffmarkierung der RNA_{Total} und Hybridisierung des Genchips®
 (Quelle: http://www.affymetrix.com/technology/ge_analysis/index.affx)

Die neue Version der Affymetrix® GenChip®- Software MAS 5.0 verwendet den „One-Step Tukey’s Biweight“ – Algorithmus. Dieser kompensiert eine nicht ideale Verteilung und Zusammensetzung der Messdaten, wie sie in der Realität häufig vorherrscht. Daher ist dieser dem in MAS 4.0 verwendeten „Average Difference“ – Algorithmus überlegen (Affymetrix®, 2002).

2.5 Statistische Auswertung

Skalierung

Die einzelnen Microarrays unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Hybridisierungseffizienz. Dieses Phänomen hat herstellungs- und experimentenabhängige Ursachen. Um Expressionswerte zwischen Experimenten und der Kontrolle vergleichen zu können, werden Signalintensitäten skaliert. Dabei werden die Gesamtintensitäten der Arrays durch sogenannte lineare Transformation untereinander angeglichen. Die Skalierung basiert auf folgender Gleichung:

$$\phi = \frac{n \sum_{i=1}^{4609} (CH_i - CHB_i)}{\sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^{4609} (CH_k - CHB_k)_j}$$

Abb. 9 Skalierung („Normalisierung“) basiert auf dieser Gleichung

Absolute Messwerte

Nach Skalierung der Signalintensitäten erhielten wir absolute Expressionswerte für die einzelnen Gene. Auch die Expression in Normalschleimhaut wurde mit dem cDNA-Array gemessen, so ließ sich jeweils das Verhältnis Tumor zu Normalschleimhaut bilden. Die Expressionsanalysen des GenChips® (Affymetrix®) beruhen auf Signalintensitäten in Geki2, HT29 und SW620. In diesen wurde die Expression der Gene in Normalschleimhaut nicht berücksichtigt.

t-Test

Nicht signifikant regulierte Gene wurden in einem t-Test ausgeschlossen. Sie erfüllten die Bedingung $p \leq 0,05$ nicht. Im t-Test wird nach folgender Gleichung gerechnet:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} - \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Abb. 10 *t-Test zur Untersuchung auf Signifikanz*

Dabei sind x_1 die Mittelwerte der Expression in den Tumorzellen und x_2 die Mittelwerte der Expression in den gesunden Schleimhautzellen beziehungsweise in den Tumorzellen nach Butyratinkubation. Mit s wird jeweils die Varianz, mit n die Zahl der Messwerte bezeichnet.

Relative Expressionswerte

Die Expressionswerte der einzelnen Gene in den verschiedenen Zellkulturexperimenten wurden in Microsoft Excel[®]- Tabellen überführt. Mit Hilfe von Microsoft Access[®] ließen sich verschiedene Microsoft Excel[®]- Tabellen verknüpfen. Durch Subtrahieren der logarithmierten Expressionswerte erhielten wir für jedes Gen den Faktoren einer Induktion (>1) beziehungsweise Suppression (<1) zwischen den Zellkulturversuchen.

Die Gene können aber mit diesen Analyseverfahren nur nach einer Bedingung sortiert werden. Bei der Suche nach ähnlich regulierten Genen müssen diese aber nach mehreren Kriterien miteinander verglichen werden, um eine möglichst große Korrelation zu erhalten. Diese Möglichkeit bieten Cluster-Analysen, auf die im Anschluss weiter eingegangen wird.

2.6 Hierarchische Cluster-Analyse der Expressionsdaten

Einfachste und gebräuchlichste Methode ist die hierarchische Cluster-Analyse. Es werden Elemente mit größter Übereinstimmung aller Kriterien in Gruppen, den Clustern zusammengefasst. Zuvor wird ein Wert festgelegt, welcher die Korrelation der Elemente innerhalb eines Clusters vorgibt und ab welchem ein abweichendes Element dem nächsten Cluster zugeordnet wird. Die Clusteranalysen erfolgen nach einem Algorithmus. Für alle Gene werden Paare gebildet und deren Korrelation berechnet, bis der höchste Wert für S , dem Grad der Ähnlichkeit zweier Gene, erreicht ist. Ein „Knoten“ zwischen diesen beiden Genen wird definiert und ein gemeinsames durchschnittliches Expressionsprofil bestimmt. Der neue Knoten geht nun als einzelnes Element in die Matrix ein. Die Software durchrechnet diese Matrix bis nur noch ein Element verbleibt.

In diesem Zusammenhang sei noch kurz auf andere Methoden der Clusteranalysen eingegangen, die sich für unsere Fragestellungen als nicht nützlich erwiesen haben. Die „K-Mean“-Clusteranalyse kommt vor allem dann in Frage, wenn hypothetisch davon ausgegangen wird oder man zuvor festlegen möchte, dass die Objekte einer bestimmte Zahl „ k “ von Clustern zugeordnet werden sollen. Durch einen Algorithmus werden die Objekte zufällig auf die „ k “ Cluster verteilt. Für jedes einzelne Cluster wird ein „Centroid“ bestimmt, der sich am Mittelpunkt der zugehörigen Objekte im Koordinatensystem befindet. Die Distanz der Objekte zu den Mittelpunkten wird berechnet. Sollten Objekt näher an anderen Centroiden sein, so werden diese zwischen den Clustern ausgetauscht. Die Centroide werden neu ermittelt und wiederum die Distanzen bestimmt. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis die Varianz innerhalb eines Clusters minimal, zwischen den Clustern aber maximal wird. Nach Durchlaufen des Algorithmus kann ein Signifikanztest eine vorherige Hypothese unterbauen oder diese widerlegen. Ein dritte Form von Clusteranalysen sind die „Self-Organizing Maps“ (Knudsen, 2002).

Distanzmessungen

Cluster-Analysen beruhen auf einer Bestimmung des Korrelationsgrades (dem „Grad der Ähnlichkeit“) von Genen zueinander. Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten zur Berechnung dieser Korrelation. Das Problem wird mit geometrisch Mitteln durch Abstandbestimmungen im Koordinatensystem gelöst. Dabei wird die Expression der Gene in ein n-dimensionales Koordinatensystem aufgetragen gedacht. Die n-Dimensionen entsprechen n-Experimenten, bei denen die Expression eines Genes untersucht werden soll (Knudsen, 2002).

Folgende Möglichkeiten der Abstandbestimmungen gibt es:

- 1.) Der Abstand zweier Punkte im Koordinatensystem wird als Strecke dargestellt.

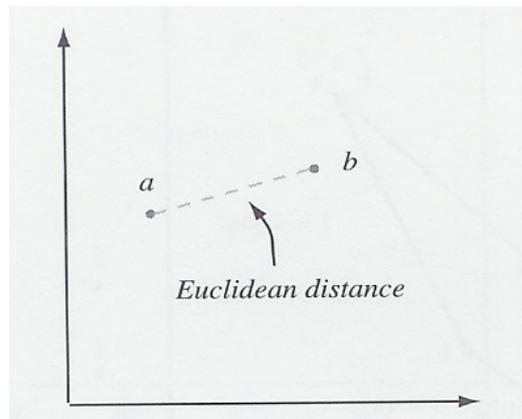


Abb. 11 *Abstand zweier Punkte im Koordinatensystem als Strecke*

Es gilt für den Abstand zwischen den Punkten a und b in einem n-dimensionalen Koordinatensystem und $i=1$:

$$\sqrt{\sum_{i=1}^N (a_i - b_i)^2}$$

Abb. 12 *Abstand zwischen zwei Punkten im Koordinatensystem, wobei N Zahl der Dimensionen, a und b zwei Objekte im Koordinatensystem*

2.) Die Distanz zwischen zwei Punkten wird als Winkel, den ihre Vektoren zum Ursprung zueinander bilden, definiert:

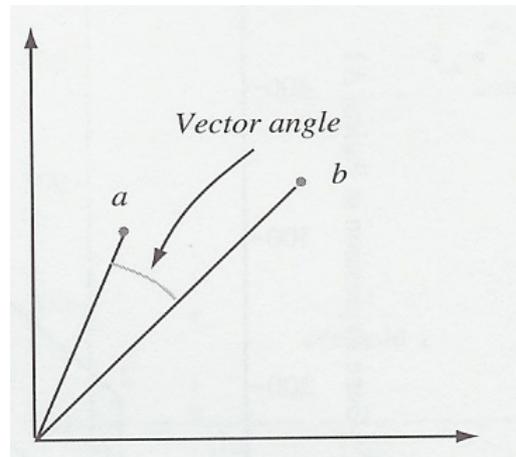


Abb. 13 Abstand zweier Punkte im Koordinatensystem als Vektorenwinkel durch den Ursprung

Es gilt für den Winkel α zwischen den Vektoren durch a und b in einem n -dimensionalen Koordinatensystem und $i=1$:

$$\cos \alpha = \frac{\sum_{i=1}^N a_i b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^N a_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N b_i^2}}$$

Abb. 14 Vektorwinkel, wobei N Zahl der Dimensionen, a und b zwei Objekte im Koordinatensystem sind

3.) Ähnlich der obigen Distanzberechnung aus dem Winkel zweier Vektoren durch den Ursprung, bedient sich der „Pearson Korrelationskoeffizient“ zusätzlich der Skalierung.

$$\frac{\sum_{i=1}^N (a_i - \bar{a})(b_i - \bar{b})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (a_i - \bar{a})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N (b_i - \bar{b})^2}}$$

Abb. 15 „Pearson Korrelationskoeffizient“, wobei N Zahl der Dimensionen, a und b zwei Objekte im Koordinatensystem sind

Clustermatrix

Das von uns verwendete Programm „Cluster, Version 2.11“ bestimmt die Korrelation der einzelnen Gene hinsichtlich ihrer Expressionsniveaus untereinander. Es wird im Internet auf <http://rana.stanford.edu/software> kostenlos zum privaten Gebrauch zur Verfügung gestellt. Der Algorithmus dieses Programms beruht auf der Methode („average-linkage“) von Sokal und Michener (Knudsen, 2002), welcher speziell für Untersuchungen der Genexpression entwickelt wurde. Der Algorithmus durchrechnet eine Matrix in einer Schleife. Diese ist eine Modifikation des Pearson Korrelationskoeffizienten. Dabei sei G_i der logarithmierte Messwert der Expression des Gens G unter der Bedingung i . Für den Grad S der Korrelation zweier Gene X und Y , deren Expression unter N verschiedenen Bedingungen untersucht werden, gilt:

$$S(X, Y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1, N} \left(\frac{X_i - X_{offset}}{\Phi_X} \right) \left(\frac{Y_i - Y_{offset}}{\Phi_Y} \right)$$

wobei

$$\Phi_G = \sqrt{\sum_{i=1, N} \frac{(G_i - G_{offset})^2}{N}}$$

Abb. 16 Grad S der Korrelation zweier Gene (X, Y)

Wird G_{offset} gleich dem Mittelwert der Messwerte von G gesetzt, entspricht Φ_G der Standardabweichung von G und $S(X, Y)$ entspricht dem Pearson Korrelationskoeffizient von X und Y (Eisen et al., 1998).

Graphische Darstellung der Cluster

Die Darstellung der Cluster geschah mit der Software „TreeView, Version 1.60“. Dieses Programm steht im Internet auf <http://rana.stanford.edu/software> kostenlos zum privaten Gebrauch zur Verfügung. In der grafischen Darstellung befinden sich die Objekte am rechten Rand einer baumartigen Aufreihung. Nach links vereinigen sich die Objekte, hier die einzelnen Gene zu Clustern bis ein Cluster alle anderen stammartig verbindet. Horizontal ist die Expression der Gene für die einzelnen Experimente farbkodiert aufgetragen. Das Farbmuster veranschaulicht das Expressionsprofil jeden Genes. Dabei gilt folgende Farbkodierung: Rot – Überexpression, Schwarz – durchschnittliche Expression, Grün – Unterexpression.

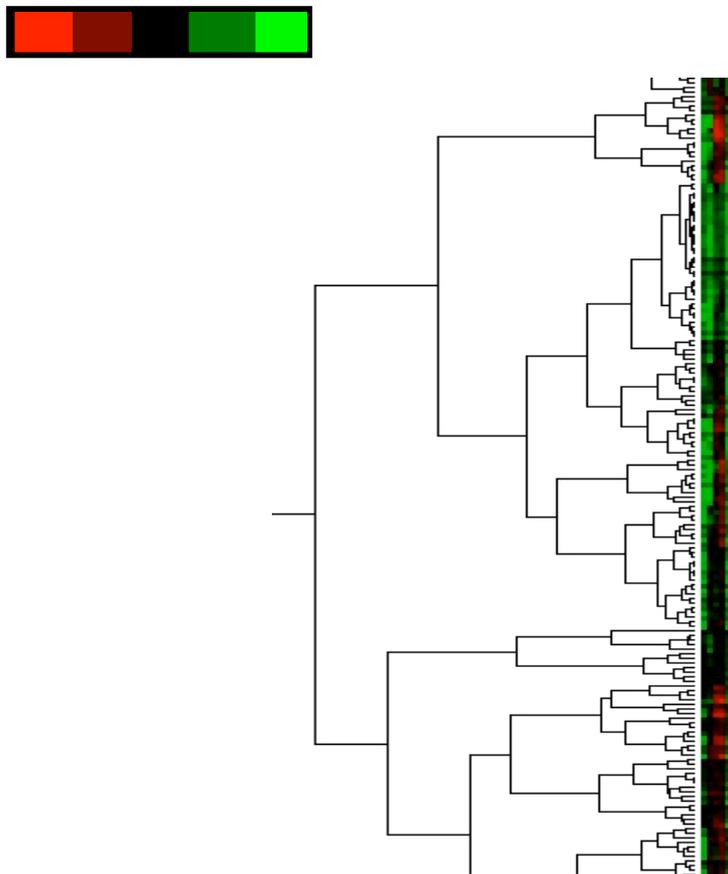


Abb. 17 Dendrogramm in „TreeView, Version 1.60“

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen nach „spotted“-cDNA-Array

Geki2-Zellkulturen

Bei Geki2 konnten folgende überexprimierte Gene mit Butyrateffekt detektiert werden ($p \leq 0,05$):

Gen	Genlocus	Geki/SH Med	Geki/SH But	But/Med
RAD21	8q24	20,95	1,74	12,04
H2BFL	6p21.3	18,96	2,32	8,17
PROSC	8p11.2	13,52	1,85	7,31
TUBA2	13q11	11,35	1,80	6,31
TUBA1	2q	10,03	1,73	5,80
F8A	Xq28	9,50	1,60	5,94
CKS1	8q21	7,57	1,93	3,92
HDGF	1q21-23	7,25	4,07	1,78
PRKAB2	1	7,21	1,52	4,74
STK18	4q27-q28	7,02	2,04	3,44
HSU53209	7	6,06	1,44	4,21
ATQ1	5q31	5,61	1,77	3,17
LOC51632	6	5,30	1,63	3,25
CDK4	12q14	4,63	1,74	2,66
PMP22	17p12-p11.2	4,26	0,53	8,04
LOC51096	17	3,92	1,18	3,32
GRB10	7p12-p11.2	3,82	1,87	2,04
M6PR	12p13	3,52	1,34	2,62

Tab. 4 *Relative Genexpression in Geki ohne (Geki/SH Med) und nach Butyratinkubation (Geki/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med).*

Die graue Markierung der Zellen, hebt ein Gen hervor, dessen Expression unter Butyrat über das normale Niveau hinaus (relativer Wert „1“), gehemmt wurde.

Für die Gene RAD21, „H2B histone family, member L“ (H2BFL), „proline synthetase co-transcribed“ (PROSC), „tubulin alpha 2“ (TUBA2), „coagulation factor VIII-associated“ (F8A) und „tubulin alpha 1“ (TUBA1) wurden in Geki2 sehr hohe Expressionen gemessen. Unter Inkubation mit Butyrat sank deren Expression auf beinahe normale Werte ab.

Für $p \leq 0,05$ verblieb ein Gen, welches im Adenom unterexprimiert war und unter Butyrat wieder deutlich induziert werden konnte. In diesem Fall, im Vergleich zur Mediumkontrolle, etwa um den Faktor sieben.

Gen	Genlocus	Geki/SH Med	Geki/SH But	But/Med
HSD11B2	16q22	0,30	2,09	6,97

Tab. 5 *Relative Genexpression in Geki ohne (Geki/SH Med) und nach Butyratinkubation (Geki/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med.).*

HT29-Zellkulturen

In HT29 konnten eine größere Zahl überexprimierter Gene mit günstigem Butyrateffekt gefunden werden ($p \leq 0,05$).

Gen	Genlocus	HT29/SH Med	HT29/SH But	But/Med
GNAS1	20q13.2-3	22,05	2,00	11,03
HDGF	1q21-23	21,50	5,12	4,20
H2BFL	6p21.3	21,21	3,08	6,89
FBL	19q13.1	19,80	2,01	9,85
PPIB	15q21-22	18,57	1,67	11,12
ATF4	22q13.1	15,42	2,57	6
TUBA1	2q	13,99	1,58	8,85
S100P	4p16	13,45	3,00	4,48
HSPA8	11q23.3-q25	12,50	1,67	7,49
XBP1	22q12.1	10,90	4,48	2,43
GPI	19q13.1	10,42	2,76	3,78
PCBP2	12q13.12-13	9,88	1,83	5,40
ODC1	2p25	8,38	0,29	28,90
FLJ20037	6	8,25	1,66	4,97
TSSC3	11p15.5	8,21	1,67	4,92
SLC3A2	11q13	8,18	1,80	4,54
SHMT2	12q12-q14	7,63	2,08	3,67
FLJ13576	7	5,77	1,57	3,68
USP15	12q14	5,73	0,57	10,05
LDHA	11p15.4	5,71	2,04	2,80
DAPK1	9q34.1	5,44	2,05	2,65
SSRP1	11q12	5,03	1,91	2,63
MYC	8q24.12-13	4,94	1,82	2,71
PYCS	10q24.3	4,82	1,75	2,75
RELB	19	4,81	0,62	7,76
ZNF162	11q13	4,43	1,61	2,75
ITGB4	17q11	4,28	1,93	2,22
CAPN1	11q13	4,25	1,96	2,17
CD81	11p15	4,01	0,31	12,94
ARL6IP	16p11.2-12	3,65	0,41	8,90
ANXA4	2p13	3,52	1,60	2,20
CYP2C9	10q24	3,38	0,43	7,86

Gen	Genlocus	HT29/SH Med	HT29/SH But	But/Med
TDG	12q24.1	3,20	0,58	5,52
ADE2H1	8	3,02	0,54	5,59
FDPS	1	2,97	0,49	6,06
APLP2	11q24	2,82	0,45	6,27
AP1B1	22q12.2	2,74	0,73	3,75
MEF2B	19p12	2,73	0,56	4,88
AGPAT1	6p21.3	2,68	0,75	3,57
IGF2R	6q26	2,62	0,63	4,16
EXT2	11p11-12	2,61	0,57	4,58
GPX4	19p13.3	2,57	0,54	4,76
CAT	11p13	2,54	0,63	4,03
DKFZP564 N1363	20	2,51	0,46	5,46
PRDX5	11q13	2,46	0,66	3,73
PPM1D	17	2,45	0,54	4,54
AARS	16q22	2,39	0,56	4,27
RELA	11q13	2,39	0,41	5,83
FUCA1	1p34	2,24	0,39	5,74
QKI	6q26-27	2,17	0,58	3,74
LU	19q13.2	2,09	0,68	3,07
RBP3	10q11.2	2,08	0,42	4,95
BZRP	22q13.31	1,98	0,66	3,00
KIAA1404	k.A.	1,74	0,52	3,35
FAT	4q34-35	1,62	0,69	2,35

Tab. 6 Relative Genexpression in HT29 ohne (HT29/SH Med) und nach Butyratinkubation (HT29/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med.).

Die Gene „guanine nucleotide binding protein“ (GNAS1), „hepatoma-derived growth factor“ (HDGF), H2B histone family, member L (H2BFL), „fibrillarin“ (FBL), „peptidylprolyl isomerase B“ (PPIB), „activating transcription factor 4“ (ATF4) und „tubulin, alpha 1“ (TUBA1) zeigten eine deutliche Induktion im Tumor, die ebenso deutlich, unter Butyrat, auf fast Normalniveau reduziert werden konnte.

Analog zu den überexprimierten Genen wurden unterexprimierte Gene aufgesucht ($p \leq 0,05$).

Gen	Genlocus	Geki/SH Med	Geki/SH But	But/Med
KIAA1621		0,12	0,31	2,58
PF4	4q12-q21	0,14	0,29	2,07
DHODH	16q22	0,14	0,31	2,21
PPP2R3	3	0,17	0,60	3,53
HSD17B7	10p11.2	0,21	0,57	2,71

Tab. 7 Relative Genexpression in HT29 ohne (HT29/SH Med) und nach Butyratinkubation (HT29/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med.).

Expressionsverhalten des HDGF-Gens

Unser besonderes Augenmerk galt dem Expressionsverhalten des HDGF-Gens ($p \leq 0,05$):

Zelllinie	Tumor/SH Med	Tumor/SH But	But/Med
Geki	7,25	4,07	1,78
HT29	21,50	5,12	4,20

Tab. 8 *Relative Genexpression in Geki und HT29 ohne (Tumori/SH Med) und nach Butyratinkubation (Tumor/SH But), Faktor des Butyrateffektes (But/Med.).*

In Geki2 wurde HDGF um den Faktor 7,25 im Vergleich zu Normalschleimhaut überexprimiert. Der Butyrateffekt betrug etwa eine Reduzierung auf die Hälfte. In HT29 konnten wir eine Induktion auf das 21,5-fache messen. Hier senkte Butyrat dessen relative Genexpression auf etwa ein Viertel.

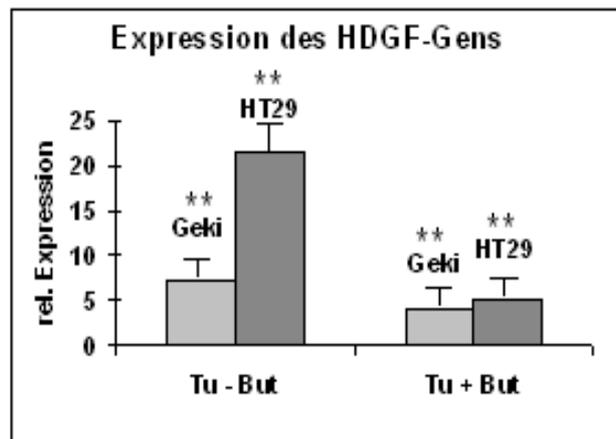


Abb. 18 *Expression des HDGF-Gens in Geki und HT29 ohne und nach Butyratinkubation, ** $p \leq 0,05$*

3.2 Clusteranalyse der „spotted“-cDNA-Array-Daten

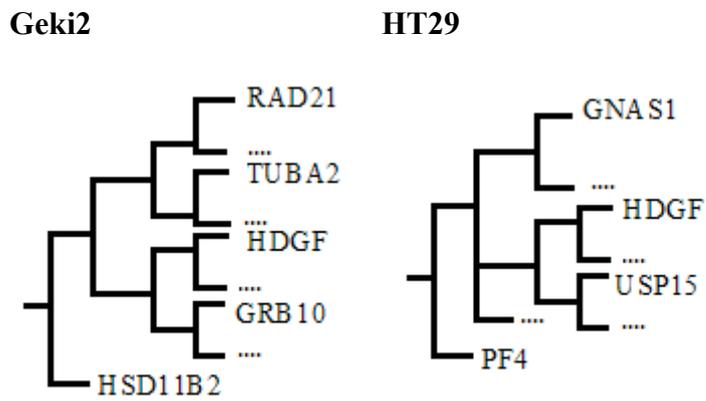


Abb. 19 Gencluster in Geki2 und HT29

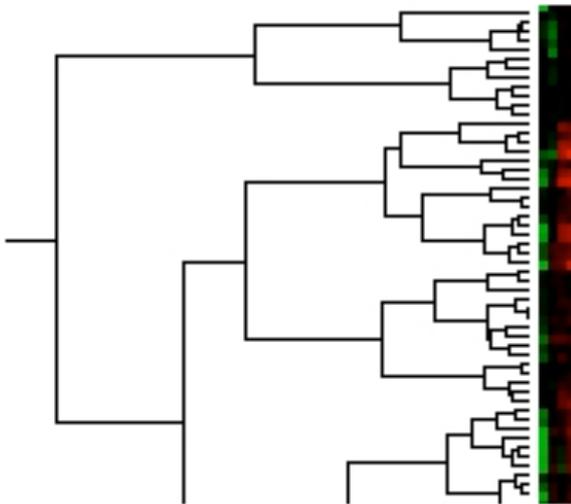


Abb. 20 Clusteranalyse aller Gene für Geki 2 und HT 29

3.3 Expressionsanalysen nach Affymetrix-GenChip

Zunächst wurden die Daten des Affymetrix-GenChips[®] von 28.869 Genen nach herkömmlicher Methode analysiert. HDGF stand als mutmaßliches Onkogen, dessen Expression durch Butyrat reguliert werden kann, im Mittelpunkt unseres Interesses. Zunächst wurde das Expressionsverhalten dieses Genes in den einzelnen Zelllinien untersucht. Die Expressionen in jeder Zellkultur wurden einmalig gemessen. Das HDGF-Gen wird auf jedem Chip zweifach detektiert (Identifikationsnummer 1499292 und 1491700).

Wir erhielten folgende Messwerte von den beiden Detektionsfeldern des HDGF-Gens:

UNIQUID	Geki Med	Geki But	HT29 Med	HT29 But	SW Med	SW But
1499292	12,41	0,67	25,08	2,59	24,08	1,74
1491700	89,06	3,49	127,08	8,45	170,70	5,81

Tab. 9 Expression des HDGF-Gens in den einzelnen Zellkulturen, gemessen auf zwei getrennten Detektionsfeldern

Bei Messung der HDGF-Expression auf zwei getrennten Detektionsfeldern, fiel die große Varianz der Messwerte auf. Es wurden die Verhältnisse Expression unter Butyrat zu Expression in den Kontrollen gebildet. Für jede Zelllinie wurde Mittelwert, Standardabweichung und das prozentuale Verhältnis der Standardabweichung zu Mittelwert gebildet:

UNIQUID	Geki But/Med	HT29 But/Med	SW620 But/Med
1499292	18,52	9,68	13,84
1491700	25,52	15,04	29,38
MW	22,02	12,36	21,61
STABW	4,95	3,79	10,99
STABW/MW	22%	31%	51%

Tab. 10 Überblick des Butyrat-effektes auf die Genexpression von HDGF in den einzelnen Zellkulturen; Mittelwert der Ergebnisse aus den zwei Detektionsfeldern (MW), deren Standardabweichung (STABW) und das prozentuale Verhältnis aus Standardabweichung zum Mittelwert (STABW/MW).

Expression des HDGF-Gens nach Messung auf zwei getrennten Detektionsfeldern mit den Identifikationsnummern UNIQID 1499292 und 1491700 des GenChips®:

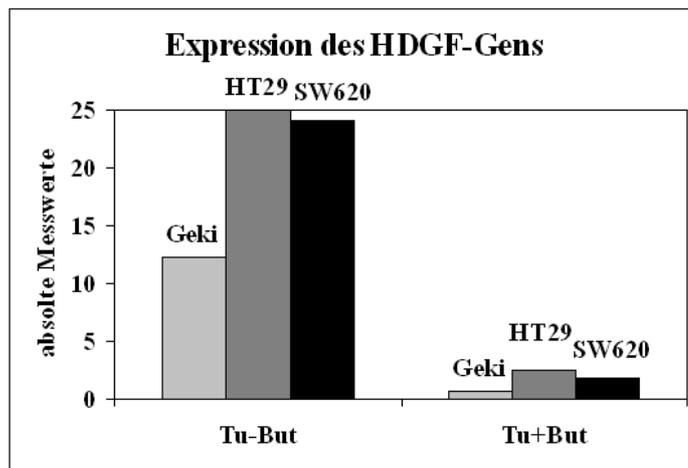


Abb. 21 Absolute Messwerte der Expression des HDGF-Gens in Geki, HT29 und SW620 ohne und nach Butyratinkubation (Identifikationsnummer 1499292)

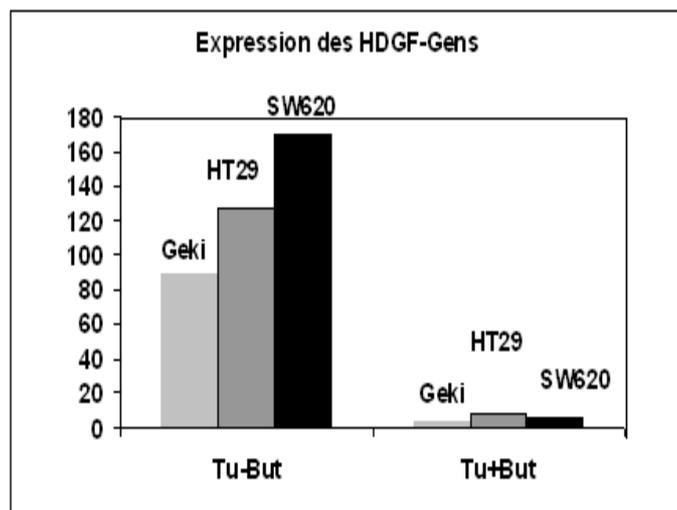


Abb. 22 Absolute Messwerte der Expression des HDGF-Gens in Geki HT29 und SW620 ohne und nach Butyratinkubation (Identifikationsnummer 1491700)

3.4 Clusteranalyse der GenChip*-Daten

Dendrogramm

Ein Dendrogramm der 8.206 Gene wurde mit „TreeView“ generiert:

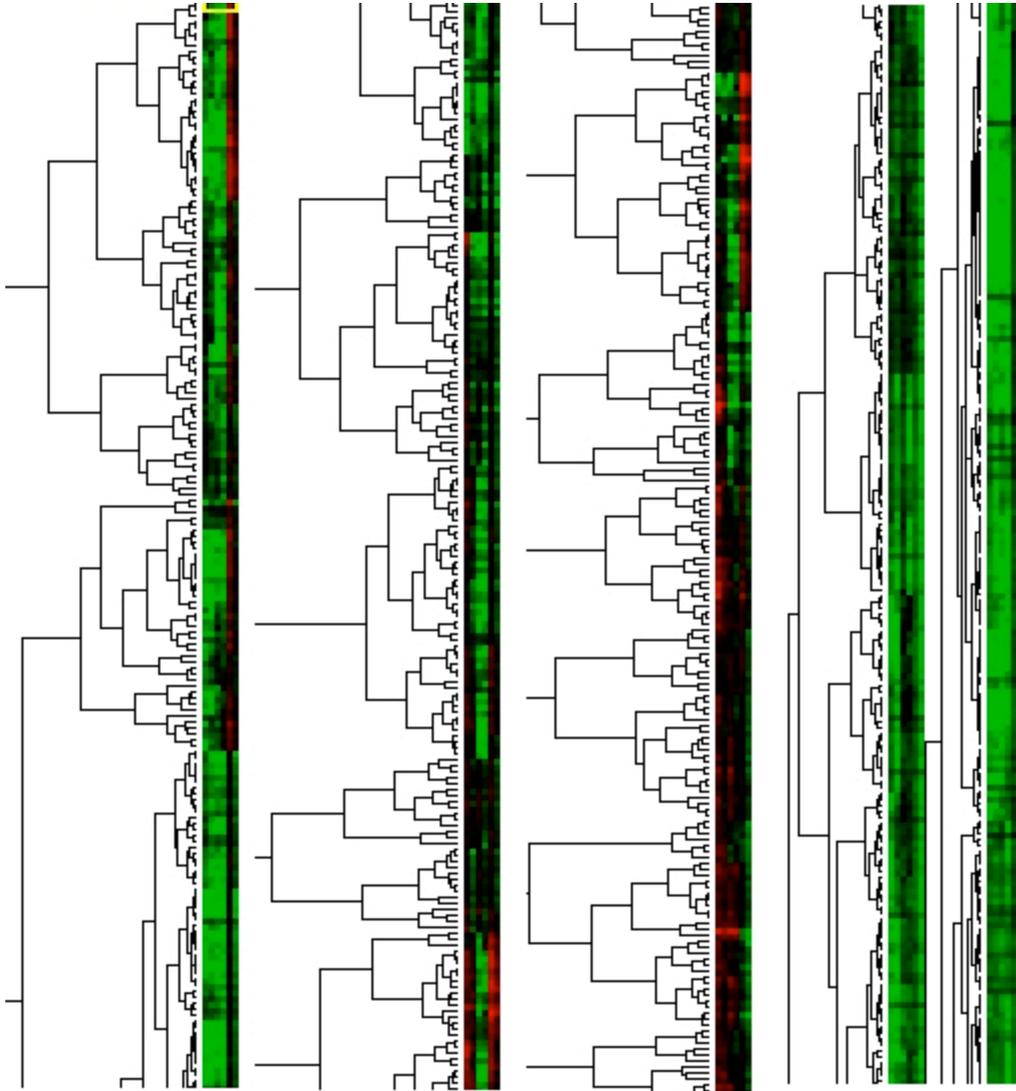


Abb. 23 Dendrogramm der 8206 Gene (Ausschnitt)

Neben den einzelnen Genen wurden die verschiedenen Zellkulturversuche auf Korrelation untersucht.

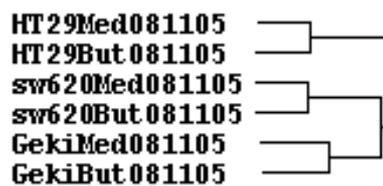


Abb. 24 Clusteranalyse der Zelllinien Geki2, HT29 und SW620 nativ (Med) und nach Butyratinkubation (But) untereinander

3.3.2 Butyrat-regulierte Gene benachbart dem HDGF-Cluster

Das Gen des Hepatoma-derived Growth Factor wurde aufgesucht. Die Expressionsprofile der beiden Detektionsfelder von HDGF (Identifikationsnummern 149929 und 1491700) befanden sich in benachbarten Clustern (vierter Ordnung). Wie erwartet, stellte sich auch im Dendrogramm der regulierende Effekt des Butyrat auf HDGF in allen Stadien dar. Die Expression der drei Mediumkontrollen wurden durch „TreeView“ mit einer **roten** Farbmarkierung, als Zeichen einer überdurchschnittlichen Expression, markiert. Die **schwarz** unterlegten Felder der butyrat-behandelten Zellen, signalisieren das Zurückfallen auf ein durchschnittliches Expressionsniveau.

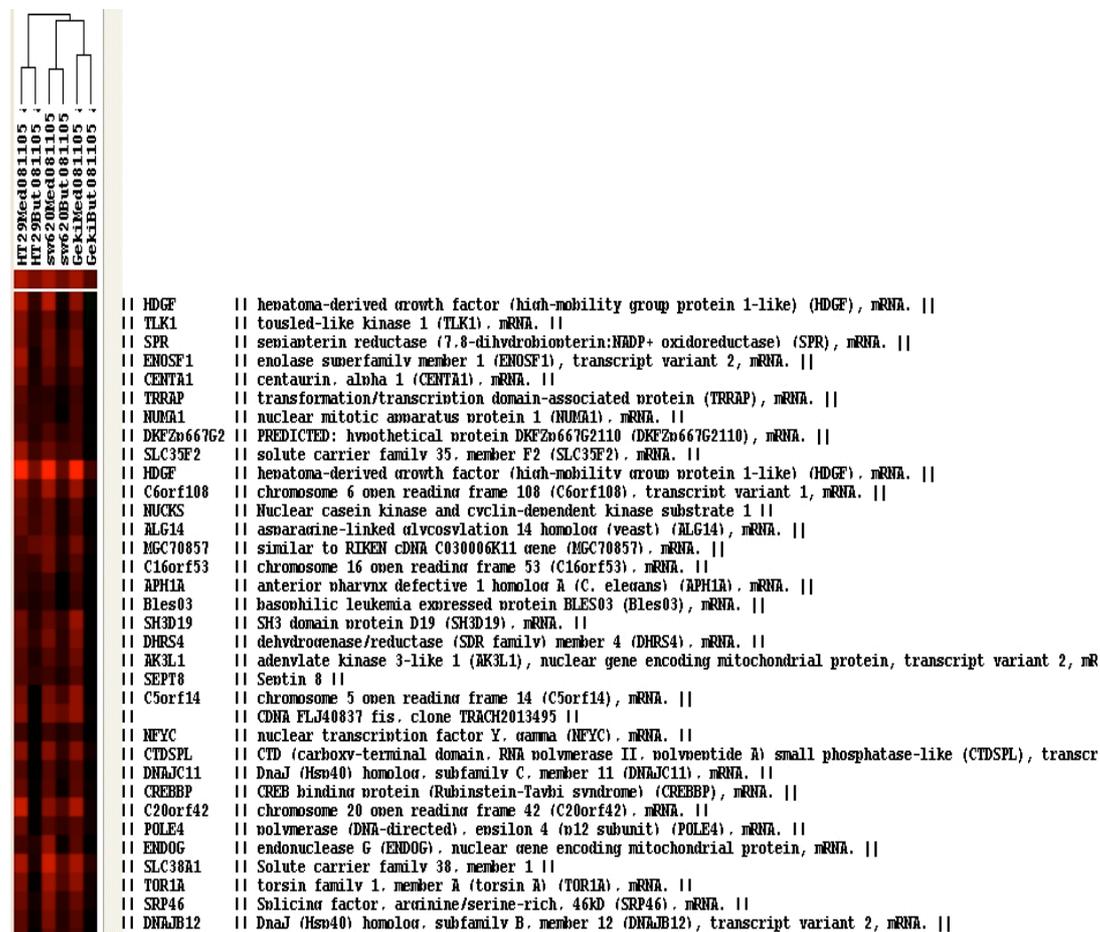


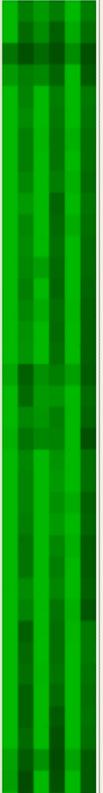
Abb. 25 *Butyrat-regulierte Gene (1. Teil) benachbert dem HDGF-Gen*

SLC25A26	solute carrier family 25, member 26 (SLC25A26), transcript variant 2, mRNA.
LOC150223	hypothetical protein LOC150223 (LOC150223), transcript variant 1, mRNA.
TJP2	tight junction protein 2 (zona occludens 2) (TJP2), transcript variant 2, mRNA.
PPAP2C	phosphatidic acid phosphatase type 2C (PPAP2C), transcript variant 2, mRNA.
MYCBP-1	membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail binding protein-1 (MYCBP-1), mRNA.
LOC57228	hypothetical protein from clone 643 (LOC57228), mRNA.
GALNT7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7) (GALNT7),
LOC339287	hypothetical protein LOC339287
JMJD1B	jumonji domain containing 1B (JMJD1B), mRNA.
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) (ERBB3), transcript variant 1, mRNA.
LOC339287	hypothetical protein LOC339287
F12	coagulation factor XII (Hageman factor) (F12), mRNA.
FND3A	fibronectin type III domain containing 3A (FND3A), mRNA.
HNRPUL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1 (HNRPUL1), transcript variant 3, mRNA.
C20orf155	Chromosome 20 open reading frame 155
CDK2AP1	CDK2-associated protein 1 (CDK2AP1), mRNA.
YAP1	Yes-associated protein 1, 65kDa (YAP1), mRNA.
DERA	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase homolog (C. elegans) (DERA), mRNA.
C18orf10	chromosome 18 open reading frame 10 (C18orf10), mRNA.
SNX5	sorting nexin 5 (SNX5), transcript variant 2, mRNA.
RAI1	retinoic acid induced 1 (RAI1), mRNA.
C20orf35	chromosome 20 open reading frame 35 (C20orf35), mRNA.
ALG5	asparagine-linked glycosylation 5 homolog (yeast, dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase) (ALG5), m
MYCBP-1	membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail binding protein-1 (MYCBP-1), mRNA.
DCTD	dCMP deaminase (DCTD), transcript variant 2, mRNA.
ANP32B	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B (ANP32B), mRNA.
REPIN1	replication initiator 1 (REPIN1), transcript variant 2, mRNA.
FLJ20171	hypothetical protein FLJ20171 (FLJ20171), mRNA.
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) (ERBB3), transcript variant 1, mRNA.
HDC2	HD domain containing 2 (HDC2), mRNA.
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)
XPO1	exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs) (XPO1), mRNA.
UFC1	ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1 (UFC1), mRNA.
SNX5	sorting nexin 5 (SNX5), transcript variant 2, mRNA.
EHF	Ets homologous factor
ENOSF1	enolase superfamily member 1 (ENOSF1), transcript variant 2, mRNA.
DKFZP56401	hypothetical protein DKFZP56401664 (DKFZP56401664), mRNA.
FLJ10407	Transmembrane protein 48
NUCKS	Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1
NSDHL	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like (NSDHL), mRNA.
MD2L1	MD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) (MD2L1), mRNA.
PHE10	PHD finger protein 10 (PHE10), transcript variant 2, mRNA.
ITGB5	integrin, beta 5 (ITGB5), mRNA.
COMT	catechol-O-methyltransferase (COMT), transcript variant S-COMT, mRNA.
RGRRA	retinoid X receptor, alpha (RGRRA), mRNA.
COMT	catechol-O-methyltransferase (COMT), transcript variant S-COMT, mRNA.
MGAT4B	mannosyl (alpha-1,3)-glucosyltransferase beta-1.4-N-acetylglucosaminyltransferase, isoenzyme B (MGAT4B)
C5orf18	chromosome 5 open reading frame 18 (C5orf18), mRNA.
EPS8L2	EPS8-like 2 (EPS8L2), mRNA.
RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3 (RHOBTB3), mRNA.
LOC203427	similar to solute carrier family 25, member 16 (LOC203427), mRNA.
TORC3	Transducer of regulated cAMP response element-binding protein (CREB) 3
C10orf74	Chromosome 10 open reading frame 74
C2orf33	chromosome 2 open reading frame 33 (C2orf33), mRNA.
SDF4	stromal cell derived factor 4 (SDF4), mRNA.
KIF9	kinesin family member 9 (KIF9), transcript variant 2, mRNA.
SDC1	syndecan 1 (SDC1), transcript variant 2, mRNA.
RKHD2	ring finger and KH domain containing 2 (RKHD2), mRNA.
TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2 (TACC2), transcript variant 3, mRNA.
UBQLN2	ubiquilin 2 (UBQLN2), mRNA.
NUCKS	Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1
NUCKS	Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1
ARMCX6	armadillo repeat containing, X-linked 6 (ARMCX6), transcript variant 2, mRNA.
RNPC2	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2 (RNPC2), transcript variant 2, mRNA.
KIF9	kinesin family member 9 (KIF9), transcript variant 1, mRNA.
FLJ20160	FLJ20160 protein (FLJ20160), mRNA.
BIRC4	baculoviral IAP repeat-containing 4 (BIRC4), mRNA.
OPRT	Ouinolinate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating))
MGC11256	hypothetical protein MGC11256 (MGC11256), mRNA.
CENTA1	Centaurin, alpha 1
LASS2	LAG1 longevity assurance homolog 2 (S. cerevisiae) (LASS2), transcript variant 3, mRNA.
PSARL	presenilin associated, rhomboid-like (PSARL), mRNA.
KIAA1049	KIAA1049 protein (KIAA1049), mRNA.
APH1A	anterior rharvnx defective 1 homolog A (C. elegans) (APH1A), mRNA.
GOSR1	golgi SNAP receptor complex member 1 (GOSR1), transcript variant 2, mRNA.

Abb. 26 *Butyrat-regulierte Gene (2. Teil) benachbert dem HDGF-Gen*

3.2.3 Butyrat-regulierte Gene mit definierter Expression

Folgendes Expressionsprofil war als eine Art Suchschablone definiert worden, mit welcher das Dendrogramm durchsucht wurde: Im Medium wäre die Expression eines möglichen Tumorsuppressorgenes in allen Stadien inhibiert (**grün**). Unter Butyrat normalisierten sich die Expressionen auf durchschnittliche Werte (**schwarz**).



	Full length insert cDNA clone YT69G03
MAPRE3	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3 (MAPRE3), mRNA.
RDH11	Retinol dehydrogenase 11 (all-trans and 9-cis)
MGC20460	Proline rich 8
ZNF336	zinc finger protein 336 (ZNF336), mRNA.
FBXO10	Chromosome 9 open reading frame 105
GJC1	gap junction protein, chi 1, 31.9kDa (connexin 31.9) (GJC1), mRNA.
ATP4B	ATPase family, AAA domain containing 3B
FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (FAIM3), mRNA.
SORBS1	Sorbin and SH3 domain containing 1
MUC6	Mucin 6, gastric
ZCCHC14	zinc finger, CCHC domain containing 14 (ZCCHC14), mRNA.
UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
C6orf84	chromosome 6 open reading frame 84 (C6orf84), mRNA.
GLS	Glutaminase
	CDNA FLJ33147 fis. clone UTERU2000218
UBE3B	Ubiquitin protein ligase E3B
	CDNA: FLJ23208 fis. clone ADSE01253
GDF5	growth differentiation factor 5 (cartilage-derived morphogenetic protein-1) (GDF5), mRNA.
FLJ20255	Hypothetical protein FLJ20255
CHD8	Chromodomain helicase DNA binding protein 8
LOC149837	Hypothetical protein LOC149837
MLST1	Male sterility domain containing 1
FER	fer (fos/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94) (FER), mRNA.
RHCE	Rhesus blood group, CcEe antigens (RHCE), transcript variant 2, mRNA.
LCN8	Linocalin 8
RIMS2	regulating synaptic membrane exocytosis 2 (RIMS2), mRNA.
LOC440331	PREDICTED: hypothetical gene supported by AK095200; BC042853 (LOC440331), mRNA.
LOC150527	Hypothetical protein LOC150527
YDR19	YD repeat domain 19
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
	Transcribed locus
C6orf152	Chromosome 6 open reading frame 152
CHER	Checkpoint with forkhead and ring finger domains
	Transcribed locus
FLJ90024	Fastin-inducible integral membrane protein TM6P1

Abb. 27 Butyrat-regulierte Gene mit einem Expressionsverhalten wie das von Tumorsuppressorgenen (1. Teil, Fortsetzung folgt).

LOC348094	hypothetical protein LOC348094 (LOC348094), mRNA.
PAPD4	PAP associated domain containing 4
LOC283050	PREDICTED: hypothetical protein LOC283050 (LOC283050), mRNA.
L3MBTL	l(3)mbl-like (Drosophila) (L3MBTL), transcript variant I, mRNA.
LOC400411	PREDICTED: hypothetical LOC400411 (LOC400411), mRNA.
	Docking protein 1-like protein
	Unknown
ATP2A1	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1 (ATP2A1), transcript variant b,
YPEL4	ymee-like 4 (Drosophila) (YPEL4), mRNA.
RYBP	RING1 and YY1 binding protein
SSK2	synovial sarcoma, X breakpoint 2 (SSX2), transcript variant 2, mRNA.
LLGL1	lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila) (LLGL1), mRNA.
MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
SLC6A6	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6
RPS6KA3	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3
IL17RD	interleukin 17 receptor D (IL17RD), mRNA.
	ESTs
C14orf44	Chromosome 14 open reading frame 44
	Homo sapiens, clone IMAGE:3608699, mRNA
	Homo sapiens, Similar to hypothetical protein, clone MGC:3451 IMAGE:3615348, mRNA, comp.
C6orf162	Chromosome 6 open reading frame 164
MAPK15	mitogen-activated protein kinase 15 (MAPK15), mRNA.
	CDNA FLJ42432 fis, clone BLADE2006412
	CDNA FLJ16240 fis, clone HCASM2003357
	Similar to Cohesin subunit SA-3 (Stromal antigen 3) (Stromalin 3) (SCC3 homolog 3)
ANUBL1	AN1, ubiquitin-like, homolog (Xenopus laevis) (ANUBL1), mRNA.
LOC283385	morn (LOC283385), mRNA.
HDAC3	Histone deacetylase 3
FLJ39582	Hypothetical LOC439931
EVI5L	Ecotropic viral integration site 5-like
ZNF297B	zinc finger protein 297B (ZNF297B), mRNA.
IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha (IL10RA), mRNA.
FLJ90805	hypothetical protein FLJ90805 (FLJ90805), mRNA.
SPG7	Spastic paraplegia 7, paraplegin (pure and complicated autosomal recessive)
SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1 (SORBS1), transcript variant 1, mRNA.
ZNF333	Zinc finger protein 333
FLJ33674	Hypothetical protein FLJ33674
INPP5F	inositol polyphosphate-5-phosphatase F (INPP5F), transcript variant 3, mRNA.
PHOSPHO1	phosphatase, orphan 1 (PHOSPHO1), mRNA.
FBXO15	F-box protein 15 (FBXO15), mRNA.
	CDNA clone IMAGE:5259272
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
PTEN	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1) (PTEN), mRNA.
KIAA1467	KIAA1467 protein
CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae) (CDC14B), transcript variant 3, mRNA.
DFNB31	deafness, autosomal recessive 31 (DFNB31), mRNA.
PREX1	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1 (PREX1), mRNA.
KCMB4	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4
FRMD6	FERM domain containing 6 (FRMD6), mRNA.
GPR124	G protein-coupled receptor 124 (GPR124), mRNA.
SLC23A2	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2 (SLC23A2), transcript variant 1,
LRRC15	leucine rich repeat containing 15 (LRRC15), mRNA.
JARID1A	Jumonji, AT rich interactive domain 1A (RBBP2-like)
DLX2	distal-less homeo box 2 (DLX2), mRNA.
RUTBC3	RUN and TBC1 domain containing 3
	Transcribed locus
MITF	microphthalmia-associated transcription factor (MITF), transcript variant 5, mRNA.
RPIP8	Rap2 interacting protein 8
CBLN1	cerebellin 1 precursor (CBLN1), mRNA.
	Homo sapiens, clone IMAGE:5189562, mRNA
ANGPTL6	angiopoietin-like 6 (ANGPTL6), mRNA.

Abb. 28 Butyrat-regulierte Gene mit einem Expressionsverhalten wie das von Tumorsuppressorgenen (2. Teil).

Ein weiteres Profil wurde wie folgt festgelegt: Im Medium durchschnittliche Expression (**schwarz**), unter Butyrat Anstieg der Expression auf überdurchschnittliche Werte (**rot**). Ein bekanntes Tumorsuppressorgen lieferte hierfür die Vorlage: das TIMP-Gen (Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinase) wies eben dieses Expressionsmuster auf.

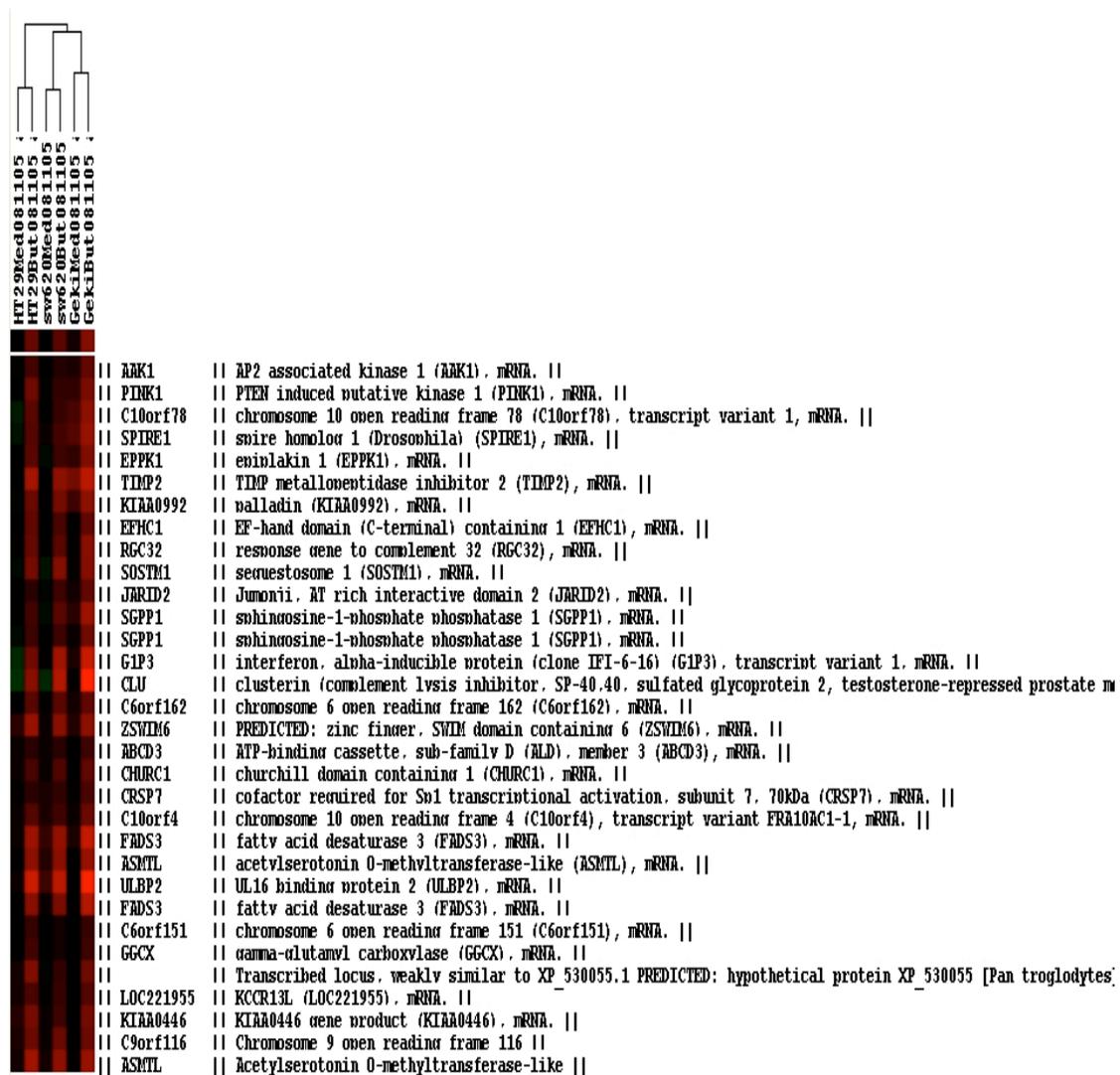


Abb. 29 Weitere mögliche butyrat-regulierte Tumorsuppressorgene

4. Diskussion

Während die antikarzinogenen Wirkungen der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auf das Kolonkarzinom bereits ausgiebig erforscht wurden (Russo et al., 1999), ist bislang noch wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt. In dieser Arbeit wurden die Genexpression von Adenom-, Karzinom- und Metastasenzelllinien umfangreich analysiert. Messungen entsprechender mRNA-Spiegel ermöglichten uns Analysen der Genexpression auf Ebene der Transkription- und Posttranskription. Neben diesen Effekten scheint Butyrat modulierenden Einfluss auf die Translation auszuüben. Dieser entgeht unseren Analysen. Doch haben Vergleiche zwischen dem ausschließlichen Histondeacetylase-Inhibitor TSA und Butyrat ergeben, dass der Hauptanteil der Butyrat-Wirkung auf einer Transkriptionsregulation beruht (Siavoshian et al., 2000).

Für das Kolonkarzinom von Ratten konnten in Microarrays eine Induktion von Genen unter Butyrat beobachtet werden, welche auf retinoidunabhängige Weise den Retinoid-Signalweg beeinflussen. So werden z.B. die Gene des Retinoidsäurerezeptors (RAR) und Retinoid-X-Rezeptors (RXR) vermehrt exprimiert. Es wird vermutet, dass dieser Komplex mit der Promotorregion von Zielgenen interagiert, welche Apoptose und Zelldifferenzierung induzieren und eine Tumorgenese reduzieren (Kameue et al., 2006).

Inhaltsstoffe in Sojamilch und Molke unterdrückten unter diätischen Bedingungen Zellproliferation und induzierten Apoptose in Kolonepithel von Ratten. Es wurde die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflusst. Zu diesem Schluss führten Genanalysen mit Microarrays nach Sektion der Ratten (Xiao et al., 2005).

Vorarbeit auf dem Gebiet umfangreicher Genexpressionsanalysen am humanen Kolonkarzinom leisteten bereits 1999 Alon et al., 2001 Notterman et al. und Kitahara et al. Zum Beispiel wurden von 9216 untersuchten Genen wurden 235 Gene während der Tumorgenese differentiell reguliert (Kitahara et al., 2001).

4.1 Butyratregulierte Onkogene

In unseren Analysen konnten 17 signifikant regulierte Gene der Adenomzelllinie Geki2 detektiert werden, welche im Tumor induziert und deren Expression durch Butyrat gehemmt werden konnten. Die Expression eines Genes (PMP22) sank nach Butyratinkubation unter das Niveau der in normalen Epithelzellen. In der Karzinomzelllinie HT29 wurden 55 Gene signifikant überexprimiert. Die Expression

dieser Gene wurde durch Butyrat reguliert, in ganzen 29 Fällen sanken sie unter die Werte gesunder Epithelzellen. Gene, die während maligner Transformation induziert werden und an der Tumorgenese beteiligt sind, erfüllen ein wesentliches Kriterium der (Proto-) Onkogene.

HDGF („hepatoma derived growth factor“)

HDGF vermitteltet proliferative Reize auf verschiedenste Zellen (Klagsbrun et al., 1986). Die Aktivierung dieses, normalerweise supprimierten Genes, während der malignen Transformation stimuliert Entdifferenzierung und Proliferation (Lepourcelet et al., 2005). Die klinische Bedeutung des HDGF wurde für andere Malignome beschrieben, so für das Leberzellkarzinom. Die Expression ist mit einer verstärkten Proliferation der malignen Zellen assoziiert und wird als prognostisch ungünstiger Faktor gedeutet (Yoshida et al., 2006). Beim Magenkarzinom korreliert HDGF-Expression mit größerer Tumorausdehnung, infiltrativem Wachstum, Blut- und Lymphgefäßinvasion, Lymphknotenmetastasen und schließlich einer kürzeren Überlebenszeit (Yamanoto et al., 2006). Weiter gilt HDGF als ungünstiger prognostischer Marker beim R0-resezierten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (Iwasaki et al., 2005). Genanntes unterstreicht die Bedeutung dieses Onkogenes. Publikationen zum klinisch-statistische Zusammenhang zwischen Expression und Prognose für das Kolonkarzinom fehlen bislang.

HDGF war nach GNAS1 („guanine nucleotide binding protein“) das im Tumor am stärksten exprimierte Gen, welches durch Butyrat inhibiert werden konnte. Die Auswertung des Affymetrix®-Genchips zeigte gleichermaßen eine deutliche Überexpression des HDGF in den unbehandelten Kulturen der Adenom-, Karzinom- und Metastasenzelllinien. Butyrat inhibiert die Expression auf ein durchschnittliches Expressionsniveau. Das Cluster des HDGF war Ausgangspunkt für die Analyse weiterer butyratregulierter Onkogene.

Funktion und Bedeutung des HDGF bei der Ätiologie und Pathogenese des Kolonkarzinoms muss weiter untersucht werden, um diesen anscheinend potenten Faktor bei der Karzinogenese besser zu verstehen.

Das Onkogen **RAD21** wurde in der Adenomzelllinie Geki2 – im Vergleich zu Normalschleimhaut – 20fach überexprimiert. Unter Butyrat wurde dessen Expression um den Faktor zwölf vermindert. Das Genprodukt spielt eine Rolle bei der Reparatur

von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie während der Mitose (HGNC). Es ist ein Hauptbestandteil der Kohäsine, welche die Schwesterchromatiden bis zur Anaphase zusammenhalten. In der Anaphase wird das Genprodukt durch Separasen, Enzyme, die den Caspasen ähneln, gespalten und die Chromatiden freigegeben. Auch zu Beginn der Apoptose wird RAD21 gespalten und dadurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus induziert (Pati et al., 2002). Es ist auch in anderen Malignomen, zum Beispiel dem Prostatakarzinom und dem Brustdrüsenkarzinom, überexprimiert (Porkka et al., 2004). Für das Brustdrüsenkarzinom konnte experimentell gezeigt werden, dass eine Suppression des RAD21 Zellwachstum hemmt und die Zytotoxizität der Chemotherapeutika Etoposid und Bleomycin verstärkt (Atienza et al., 2005). RAD21 bietet einen möglichen Angriffspunkt adjuvanter Therapiestrategien. Dessen Bedeutung beim Kolonkarzinom muss weiter untersucht werden.

Ein weiteres Gene, welches bei anderen Neoplasien mit einer schlechten Prognose einhergeht, ist das des **CKS1** („CDC28 protein kinase regulatory subunit 1“). Beim multiplen Myelom ist dessen Expression mit einem Mangel an p27Kip1 assoziiert, welcher mit höherer Aggressivität der Erkrankung einhergeht (Shaughnessy et al., 2005).

Für **STK18**, auch PLK4 (polo-like kinase 4) bezeichnet, wurde bereits an verschiedenen Tumormodellen gezeigt, dass eine Suppression dieses Genes durch Histondeacetylase-Inhibitoren, Apoptose induziert. PLK-Überexpression vermindert p53-induzierte Apoptose, Butyrat hemmt dessen Transkription (Li et al., 2005). Auch für **CDK4** („cyclin dependent kinase“) konnte aus immunzytochemischen Untersuchungen histologischer Proben ein Zusammenhang zwischen maligner Transformation und Expression dieses Genes geschlossen werden. In Zellen des Kolonkarzinoms wurden deutlich induzierte Expressionen gemessen (Zhao et al., 2006).

Die Expression des **GRB10** („growth factor receptor-bound 10“) ist mit vielen anderen Malignomen, zum Beispiel dem Plattenepithelkarzinomen der Zervix, assoziiert (Okino et al., 2005). Es könnte daher als Proto-Onkogen wirken. Über dessen Funktion während der Tumorprogression des Kolonkarzinoms ist bislang nichts bekannt.

In HT29 ist **GNAS1** („Galpha-Gen“) das am stärksten exprimierte Gen im Tumor, welches durch Butyrat reguliert wird. Es führt zu einer Aktivierung des cAMP-abhängigen Signalweges und vermittelt bei hypophysären Tumoren Wachstumsvorteile

(Spada et al., 2007). Bei kolorektalen Karzinomen im UICC-Stadium I und II spielt dessen genetischer Polymorphismus eine bedeutende Rolle: Der Genotyp T393C geht mit einer schlechteren Prognose einher (Frey et al., 2005). Die supprimierende Wirkung des Butyrats auf die Expression muss weiter funktionell untersucht werden.

S100P stimuliert Zellproliferation und verlängert die Überlebenszeit der Zellen durch Aktivierung von Überlebensfaktoren. Es wird in vielen malignen Neoplasien exprimiert. In Zellkulturexperimenten wurde eine Korrelation zwischen S100P und Zellproliferation, der Überlebenszeit, der Aktivität von Erk und NF-kappaB beobachtet. S100P scheint mit dem RAGE („receptor for activated glycation end products“) - Signaltransduktionsweg zu interagieren (Arumugam et al., 2004). Die Aggressivität des Pankreaskarzinoms wird von S100P mitbestimmt: Die Höhe der S100P-Konzentrationen ist nicht nur mit Proliferation und verminderter Apoptose assoziiert, sondern auch mit einem invasiven Wachstum des Tumors (Arumugam et al., 2005). **ODC** ist assoziiert mit Tumorprogression und Angio(neo)genese verschiedener Malignome. Eine ODC vermittelte Suppression der Endostatin-Transkription in den Tumorzellen, scheint Proliferation des Endothels zu induzieren (Nemoto et al., 2002).

Der zugrunde liegende Mechanismus des **SLC3A2** (CD98hc) bei der malignen Transformation beruht auf einer assoziativen Bindung an β_1 -Integrine. Integrine sind Transmembran-Rezeptoren, welche durch extrazelluläre Liganden aktiviert werden. Sie übermitteln Signale für verschiedene zellphysiologische Vorgänge, wie morphologische Erscheinung, Adhäsion, Migration, Wachstum, Proliferation und Differenzierung. Die Transformation vieler maligner Tumoren beruht auf Störungen der Integrinfunktion durch exprimierte Proto-Onkogene. Die Assoziation der Integrine mit SLC3A2 eröffnet neue therapeutische Zugänge in die malignen Zellphysiologie. Suppression der Expression stabilisiert den Wachstumsreiz dieser Zellen (Henderson et al., 2004).

Die Laktatdehydrogenase 5 (LDH5 = **LDHA**) ist eins von fünf Isoenzymen, welches anaerobe Glykolyse katalysiert und dessen Genexpression durch den Hypoxiefaktor HIF1 α und 2 α induziert wird. Koukourakis et al. bestätigten das Zusammenspiel von LDH5 und HIF1 α /2 α in immunhistochemischen Untersuchungen für das kolorektale Karzinom. HIF1 α korreliert weiter mit der Höhe der Wachstumsfaktoren VEGF („vascular endothelial growth factor“) und VD („vascular density“), sowie der Invasivität, Lymph- und Fernmetastasierung. Die Höhe der LDH5-Expression ist daher

als Marker für besonders aggressives Verhalten eines Kolonkarzinoms zu werten (Koukourakis et al., 2005).

SSRP1 („structure-specific recognition protein 1“) ist entscheidend an Transkription und Replikation der DNA beteiligt. Während der Apoptose muss es in zwei Schritten durch eine Caspase und ubiquitin-abhängige Protease deaktiviert werden (Landais et al., 2006). Über die Bedeutung der SSRP1-Überexpression in Zellen des Kolonkarzinoms ist bislang nichts veröffentlicht worden. Womöglich stimuliert die Suppression dieses Gens durch Butyrat Apoptose in den neoplastischen Zellen.

Die Expression des Onkogens **c-MYC** korreliert mit der des Beta 4-Integrins (**ITGB4**). ITGB4 ist ein Adhäsionsrezeptor auf normalen Epithelzellen, meist als Teil der Hemidesmosomen, der mit dem Intermediärfilament assoziiert ist. Durch bestimmte Faktoren wird ITGB4 aus der Bindung an Hemidesmosomen mobilisiert. Dadurch verstärkt sich dessen Potential zur Transduktion von Wachstumssignalen, die über Rezeptoren für Wachstumsfaktoren vermittelt werden. Folge ist die Aktivierung der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) mit Induktion von Zellmigration, Invasion und einer Hemmung der Apoptose. Bedeutender ist wohl die Tatsache, dass ITGB4 die Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF und andere induziert, welche als potente Stimulatoren auf para- und autokrinen Wege wirken (Lipscomb et Mercurio, 2005). ITGB4 ist daher wichtiger Bestandteil der Angiogenese während der invasiven Phase des Karzinoms (Nikolopoulos et al., 2004).

Die Regulation des Onkogens **c-MYC** durch Butyrat ist bereits detailliert bekannt. Die kurzkettige Fettsäure reduziert die Menge an mRNA des c-Myc durch Modifikation auf posttranskriptionalem Wege (Souleimani et Asselin, 1993). Das c-MYC-Gen (Max Planck Institut für Biochemie, 2007) wird durch verschiedenste Zellsignale induziert und ist in den meisten Karzinomen dysreguliert. Die Expression dieses Gens lässt den Zellzyklus voranschreiten. Als Schutzmechanismus vor enthemmter Zellproliferation, leitet c-MYC, bei Nichtvorhandensein von Zellüberlebensfaktoren, p53-vermittelte Apoptose ein. Dieser Mechanismus wird aber durch Bcl-2 oder IGF-1 gehemmt, so dass die antikarzinogenen Eigenschaften des c-MYC neutralisiert werden. Das Onkogen c-MYC reguliert wiederum mehr als 400 Gene, zum Beispiel induziert es CDK4 (siehe oben) und inhibiert p15 und p21 (Menssen et Hermeking, 2002). Diese sind mitverantwortlich für die umfangreichen Funktionen des c-MYC. Die antikarzinogenen Wirkungen des Butyrats lassen sich an der Regulation dieses Gens besonders gut nachvollziehen.

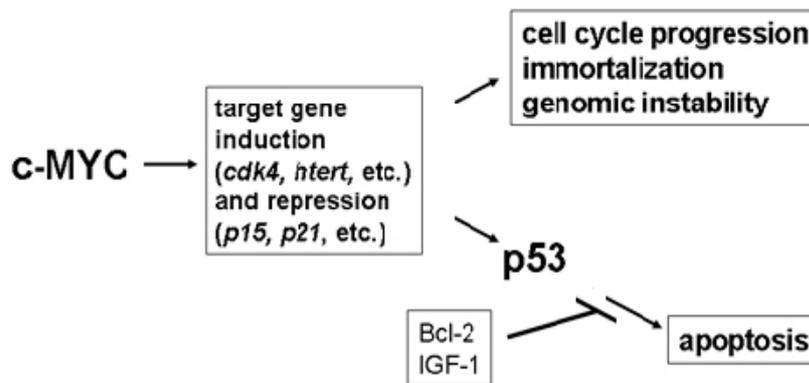


Abb. 30 (Quelle: Max Planck Institut für Biochemie, 2007)

Zimmermann et al. untersuchten die Expression des Annexin IV-Gens (ANXA4) im klarzelligen Karzinom der Niere. Es konnte demonstriert werden, dass überexprimiertes **ANXA4** Zellmigration vermittelt (Zimmermann et al., 2004). Dieses Gen ist womöglich auch beim Kolonkarzinom mitverantwortlich für den Verlust der Zell-Zell-Kontakte und damit Streuung der malignen Zellen.

Enzyme des Cytochrom P450-Systems (CYP) katalysieren verschiedenste Stoffwechselforgängen im menschlichen Körper. Sie kommen vor allem in der Leber vor. **CYP2C9** wird auch im Intestinaltrakt exprimiert. Dort wird diesem eine Rolle bei der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms zugesprochen, indem es Nahrungsbestandteile zu Karzinogenen und Mutagenen verstoffwechselt. Dessen genetischer Polymorphismus bestimmt die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms als sekundärer Risikofaktor mit. Hohe Aktivität ist mit höherer Inzidenz assoziiert (Martinez et al., 2001). Über Transkriptionshemmung dieses Enzymsystems vermittelt Butyrat womöglich seine beschriebenen präventiven Eigenschaften.

Notarnicola et al. untersuchten die Aktivität von Farnesyl-Diphosphat-Synthasen (**FDPS**) in Gewebeproben des Kolonkarzinoms. Es wurden erhöhte mRNA-Spiegel in den Zellen gemessen. Mit Hilfe eines FDPS-Inhibitors, des Pamidronats, konnte die Wirkung auf Zellwachstum und Apoptose gezeigt werden. Pamidronat reduzierte bei in-vitro Experimenten Zellwachstum deutlich und vermittelte einen proapoptotischen Effekt (Notarnicola et al., 2004).

IGF („insulin-like growth factor“) ist ein regulierender Faktor bei der Proliferation und Apoptose von Zellen. Dessen Expression geht beim kolorektalen Karzinom mit

höherem Zellumsatz und wohl einer schlechteren Prognose einher (Fu et al., 2007). Schon 2002 berichteten Moschos und Mantzoros über den IGF als unabhängigen Faktor in der Pathogenese maligner Tumoren. Er stimuliert Zyklusprogression und hemmt Apoptose. Dabei interagiert dieser entweder direkt mit anderen Wachstumsfaktoren oder indirekt mit etablierten Signaltransduktionswegen wie den Integrinen (Moschos und Mantzoros, 2002). Bei Ewing-Sarkomen stimuliert IGF autokrin über dessen Rezeptor die Synthese neovaskulärer Substanzen wie VEGF-A (Strammiello et al., 2003).

Die Funktion des „Nuclear Factor KappaB“ (**NF-KappaB**) an der Pathogenese des Kolonkarzinom wurde von Yu et al. untersucht. In unseren Experimenten wird NF-KappaB als „RelA“ bezeichnet. Erhöhte Spiegel des NF-KappaB führen zu einer starken Verminderung der Apoptose. Diesem liegt eine durch NF-KappaB vermittelte Expression des Bcl-2 und Bcl-x(L) zugrunde (Yu et al., 2004).

Das Basalzell-Adhäsionsmolekül (**B-CAM**) ist in einer Vielzahl maligner Tumoren überexprimiert. Als Adhäsionsrezeptor ist es womöglich, zusammen mit anderen Rezeptormolekülen, an Transformation und Metastierung beteiligt (Eyler und Telen, 2006). Das aus der gleichen Immunglobulinsuperfamilie stammende „Lutheran-Glykoprotein“ (**LU**) ist in HT29 induziert. Butyrat stabilisiert die Expression dieses Genes. Die Expression des Benzodiazepin-Rezeptorproteins (BZRP) wurde von Maaser et al. als relevanter prognostischer Faktor bei kolorektalen Karzinomen im Stadium UICC III gewertet. Über den Benzodiazepin-Rezeptor wird Zellwachstums kontrolliert (Maaser et al., 2002). Die Expression ist in HT29 zweifach induziert und wird durch Butyrat um den Faktor drei gehemmt.

4.2 Butyratregulierte Tumorsuppressorgene

Die Expression der Hydroxysteroid-Dehydrogenase 11-beta 2 (**HSD11B2**) ist in Adenokarzinomzellen des Kolons gesteigert. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Konversion des hormonell aktiven Cortisols in Cortison. Über dessen Genexpression werden die Wirkungen der Glukokortikoide prä-rezeptorisch reguliert. Glukokortikoide beeinflussen Zellproliferation und –differenzierung und hemmen das Wachstum verschiedener Kolontumoren (Zbankova et al., 2004). HSD11B2 gilt daher als Tumorsuppressorgen.

Plättchenfaktor 4 hemmt Zellproliferation, Zellmigration und Angiogenese in Zellkulturexperimenten und reduziert Zellwachstum in Untersuchungen an Patienten. Die Unterdrückung der Angiogenese beruht auf Interaktion von **PF4** mit Wachstumsfaktoren wie FGF und VEGF und einer direkten Interaktion mit Wachstumsrezeptoren auf der Zelloberfläche (Bikfalvi et Gimenez-Gallego, 2004). In molekularbiologischen Untersuchungen an Zellen des Multiplen Myeloms wurde eine Inaktivierung von PF4 beobachtet, welche durch Hypermethylierung dessen Promoterregion zustande kommt. Sie ist Bestandteil der mehrstufigen Tumorgenese des Multiplen Myeloms (Cheng et al., 2007).

Das Produkt des **PPP2R3**-Genes ist ein Regulator von Zellmigration während der embryonalen Achsausrichtung (Creyghton et al., 2005). Dessen Funktion beim Kolonkarzinom ist bislang ungeklärt. Die kurzkettige Fettsäure Butyrat induzierte diese im Tumor supprimierten Gene.

4.3 Das HDGF-Cluster

HDGF fiel durch deutliche Induktion in den verschiedenen Stadien des Tumors auf. Die Expression dieses Genes wird durch Butyrat reguliert. Die Bedeutung dieses Wachstumsfaktors bei der Tumorgenese und für die Prognose des kolorektalen Karzinoms wurde bereits oben beschrieben. Messungen mit dem Affymetrix®-Genchips® bestätigten eine deutliche Überexpression des HDGF in den unbehandelten Kulturen der Adenom-, Karzinom- und Metastasenzelllinien. Butyrat reduziert die Expression auf durchschnittliche Werte. Mit Clusteranalysen konnten, zusätzlich zu den obengenannten Genen, weitere butyrat-regulierte Gene mit einem für Onkogenen typischem Expressionsprofil detektiert werden:

TLK (Tousled-like Kinase 1) ist eine Threoninkinase, die eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielt. In Experimenten ging eine induzierte TLK-Expression mit andauernder DNA-Replikation einher (Sillje et al., 1999). Dieses kann als ein gewichtiger Faktor bei der malignen Dysregulation gedeutet werden. Für das Brustdrüsenkarzinom stellten Norton et al. fest, dass eine Assoziation zwischen erhöhter TLK-Genexpression und erhöhter Genexpression des bekannten Onkoproteins eIF4E existiert. Letzterer ist als Transkriptionsfaktor an der malignen Transformation beteiligt (Norton et al., 2004). Die strahlenstabile TLK wirkt paradoxerweise als Promotor von Reparaturmechanismen bei DNA-Doppelstrangbrüchen (Sunavala et al.; 2005). Doppelstrangbrüche treten bei Einwirkung von ionisierender Strahlung und

alkylsierenden Substanzen wie Doxorubicin auf Zellen in Erscheinung, wie sie in der Therapie maligner Erkrankungen erwünscht sind. Durch Induktion von TLK erhöht sich die Strahlenresistenz der Tumorzellen. Die Zellen sprechen schlechter auf eine Strahlentherapie oder zytostatische Therapie mit Doxorubicin an. Durch die Normalisierung des Expressionsniveaus von TLK durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat könnte die radiogene Sensibilität der Zellen erhöht werden. Butyrateffekte auf die Strahlensensibilität maligner Zellen wurden beim malignen Melanom (Munshi et al., 2005), bei malignen Gliomen (Entin-Meer, 2005) und auch für das Kolonkarzinom (Arundel et al., 1985) untersucht. In allen Fällen verbesserte Butyrat das Ansprechen der malignen Zellen.

Ein weiteres Gen aus dem HDGF-Cluster ist das Transformation-transactivation domain-associated protein- Gen (**TRRAP**). Das Translationsprodukt ist eine Histonacetyltransferase (HAT). Sie gelten als die Gegenspieler der Histondeacetylase und regulieren die Transkription (Robert et al., 2006). TRRAP ermöglicht die Aktivierung einer normalerweise ruhenden Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) durch die Onkoproteine C-Myc oder N-Myc. Über die Induktion der Myc-Oncogene ist bekannt, dass diese mit vielen Malignomen assoziiert sind und dass deren Translationsprodukte einen progressiven Effekt auf den Zellzyklus besitzen (Nikiforov et al., 2002). **HDGF** und **TRRAP** spielen eine physiologische Rolle in der embryonalen Entwicklung. Interessanterweise ist TRRAP ebenso wie TLK ein Teil des zellulären Schutzmechanismus gegen DNA-Doppelstrangbrüche: Es ist beteiligt bei der Detektion, Signalisierung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Dazu wurden Lymphozyten von Personen untersucht, die zufällig mit ionisierender Strahlung exponiert wurden. Es wurde eine Induktion von TRRAP festgestellt. Dieser Reparaturmechanismus ist unter Butyrat reduziert (Sakamoto-Hojo et al., 2003). Inwiefern dies erwünscht ist oder nicht zur Therapie beiträgt, sollte gezielt untersucht werden.

Das Basophilic-Leukemiaexpressed-Protein- Gen (**BLES 03**) wird in Zellen der basophilen Leukämie, einer seltenen Sonderform der chronisch myeloischen Leukämie (CML), überexprimiert. Bitto et al. stellten in molekularen Strukturanalysen eine Ähnlichkeit zwischen BLES03 und dem Onkoprotein eIF4E fest (Bitto et al., 2005). Da eIF4E als Transkriptionsfaktor an maligner Transformation beteiligt ist, scheint BLES03 als verstärkender Faktor zu wirken. Über die Wirkung des BLES03 an der

Pathogenese des Kolonkarzinoms existieren bislang keine Daten. Doch spricht dessen Expressionsverhalten für eine Beteiligung an Transformation und Tumorprogression.

4.4 Weitere butyrat-regulierte Onko- und Tumorsuppressorgene

Neben Expressionsanalyse des bekannten Onkogens HDGF und Untersuchung des zugehörigen Gen-Clusters, wurde nach weiteren butyrat-regulierten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gefahndet. Es wurden bestimmte Expressionsprofile definiert, die anschließend als Suchschablone entsprechende Cluster detektierten. Mit dieser Methode ließen sich die Effekte des Butyrats auf die Expression der Gene am gezieltesten untersuchen. Es besteht aber eine große Variabilität unter den Profilen, so dass womöglich nicht das gesamte Spektrum der Butyratwirkung erfasst werden konnte. Auf der anderen Seite wurden viele Gene detektiert, denen keine Funktion in der Pathogenese zugesprochen werden konnten. Anders als HDGF, könnten weiter butyrat-regulierte Onkogene folgendes Expressionsprofile aufweisen: Nur in einem Stadium der Karzinogenese, zum Beispiel dem der Metastase (SW620), würde man eine Überexpression beobachten, welche unter Butyrat auf ein normales oder unterdurchschnittliches Expressionsprofil zurückfielen. In jedem Stadium könnten solche Gene differentiell reguliert werden. Die Suche nach Genen mit allen denkbaren Profilen, würde mit immensen Aufwand einhergehen, aber nur dieser würde die Analyse der Butyratwirkung komplettieren.

4.5 Tabellarische Übersicht über die detektierten Gene

Gen	Butyrat- effekt	Genfunktionen in der Pathophysiologie des Kolon-Ca
Geki2		
HDGF	↓	Zellproliferation, Entdifferenzierung, Tumorprogression (Invasion, Metastasierung) höhere Aggressivität
RAD21	↓	<i>hemmt Apoptose, Zellproliferation</i>
CKS1	↓	<i>höhere Aggressivität</i>
STK18=Plk4	↓	<i>hemmt p53-induzierte Apoptose</i>
CDK4	↓	maligne Transformation wird durch c-MYC induziert
GRB10	↓	?
HSD11B2	↑	reguliert Zellproliferation, Zelldifferenzierung, hemmt Zellwachstum
HT29		
GNAS1	↓	<i>Zellwachstum</i> ungünstiger prognostischer Faktor
HDGF	↓	Zellproliferation, Entdifferenzierung, Tumorprogression (Invasion, Metastasierung) höhere Aggressivität
S100P	↓	<i>hemmt Apoptose, Zellproliferation, Invasion,</i> <i>höhere Aggressivität</i>
ODC	↓	<i>Tumorprogression und Angiogenese</i> <i>(Endothelproliferation)</i>
SLC3A2= CD98hc	↓	<i>Transformation, Zellwachstum</i>
LDHA	↓	anaerobe Glykolyse höhere Aggressivität
DAPK1	↓	?
SSRP1	↓	? (<i>hemmt Apoptose?</i>)
c-MYC	↓	Zellproliferation, hemmt p53-abhängige Apoptose genomische Instabilität, induziert eine Reihe anderer Gene mit karzinogenen Eigenschaften assoziiert mit ITGB4
ITGB4	↓	Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren Zellmigration, Invasion, hemmt Apoptose Angiogenese assoziiert mit c-MYC
CD81	↓	<i>Zellproliferation</i>
ANXA4	↓	<i>Zellmigration</i>
CYP2C9	↓	Katalyse, Bildung von Karzinogenen im Darm
FDPS	↓	Zellwachstum, hemmt Apoptose
IGF2R	↓	Zellproliferation, hemmt Apoptose
NF-KappaB=	↓	hemmt p53-abhängige Apoptose über Bcl-2

RelA		
LU=B-CAM	↓	hemmt Zelladhäsion, Metastasierung
BZRP	↓	Zellwachstum, Prognosefaktor
PF4	↑	hemmt Zellproliferation, hemmt Zellwachstum, hemmt Zellmigration und hemmt Angiogenese
PPP2R3	↑	? <i>Zellmigration</i>

Tab. 11 Zusammenfassung: Butyrateffekte, Gene und Pathophysiologie des Kolon-Ca; kursiv gedruckt sind Genfunktionen, die an anderen Malignomen beobachtet wurden und denen möglicherweise ähnliche Funktionen in der Pathophysiologie des Kolon-Ca zugesprochen werden können

4.6 Zusammenfassung

Die molekularen Effekte der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auf das Kolonkarzinom und dessen Vorstufen sind vielfältig. Wir konnten eine große Anzahl von Genen detektieren, deren Expressionsprodukte als Onkoproteine an Immortalisierung, Zellproliferation, Migration, Tumorprogression, einschließlich Angiogenese, beteiligt scheinen und deren Expression sich durch die Butyrat inhibieren ließ. Einige, aus der Literatur bekannten Tumorsuppressorgene konnten unter Butyrat reexprimiert werden. Antikarzinogene Wirkungen des Butyrats lassen sich, unter anderem, durch die Regulation solcher Gene erklären. Die präventive Bedeutung einer ballaststoffreichen Ernährung - als Voraussetzung hoher Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren im Colon – konnte somit teilweise molekularbiologisch untermauert werden. Es sei aber darauf verwiesen, dass diesen Erkenntnissen Zellkulturexperimente zugrunde liegen, die den in-vivo- Bedingungen bestmöglich angepasst wurden, aber nie das komplexe System des menschlichen Körpers im vollen Umfang wiedergeben konnten. Weiter müssen die detektierten Gene funktionell analysiert werden, um so deren Anteil an Pathogenese und „Butyrateffekt“ des Kolonkarzinoms bewerten zu können. Inwiefern Butyrat therapeutisch eingesetzt werden kann, muss tierexperimentell und später klinisch geprüft werden. Womöglich stellen kurzkettige Fettsäuren eine neue Substanzklasse in der adjuvanten, genmodulierenden Therapie dar. Es bleibt zu hoffen, dass verbesserte adjuvanten Therapiestrategien, auch im Stadium des metastasierten Karzinoms, die Progredienz dieser Erkrankung dermaßen verlangsamt, dass zukünftig von einer chronifizierten malignen Erkrankung gesprochen werden darf oder solche Erkrankungen präventiv verhindert werden können.

LITERATURVERZEICHNIS

Abouzied MM, Baader SL *et al.*: Expression patterns and different subcellular localization of the growth factors HDGF and HRP-3 suggest functions in addition to their mitogenic activity. *Biochem J* 2004; **378**: 169-76

Alon U, Barkai N, Notterman DA *et al.* Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1999; **96**:6745-50.

Andoh A., Tsujikawa T. *et al.* : Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr Pharm Des* 2003; **9**(4): 347-58

Arumugam T, Simeone DM, Schmidt AM *et al.* : S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J Biol Chem.* 2004; **279**(7): 5059-65

Arumugam T, Simeone DM, Van Golen K *et al.* : S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. *Clin Cancer Res.* 2005; **11**(15): 5356-64

Arundel CM, Glicksman AS *et al.* : Enhancement of radiation injury in human colon tumor cells by the maturation agent sodium butyrate (NaB). *Radiat Res* 1985; **104**(3): 443-8

Atienza JM, Roth RB, Rosette C: Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2005; **4**(3): 361-8

Augenlicht LH, Mariadason JM, Wilson A *et al.* Short Chain Fatty Acids and Colon Cancer. *American Society for Nutritional Sciences* 2002; 3804-8

Aviram A, Zimrah Y, Shaklai M *et al.*: Comparison between the effect of butyric acid and its prodrug pivaloyloxymethylbutyrate on histones acetylation in an HL-60 leukemic cell line. *Int J Cancer*. 1994; **56**(6): 906-9

Bikfalvi A, Gimenez-Gallego G: The control of angiogenesis and tumor invasion by platelet factor-4 and platelet factor-4-derived molecules.

Semin Thromb Hemost. 2004; **30**(1): 137-44

Bingham SA, Hughes R, Cross AJ: Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response.

J Nutr. 2002; **132**: 3522S-3525S

Bingham SA, Day NE, Luben R *et al.* : Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361: 1496-1501

Bitto E, Bingman CA *et al* : The structure at 2.5 Å resolution of human basophilic leukemia-expressed protein BLES03.

Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun 2005; **61**(9): 812-7

Boffa LC, Gross RJ, Allfrey VG: Manifest effects of sodium butyrate on nuclear function. Selective and reversible inhibition of phosphorylation of histones H1 and H2A and impaired methylation of lysine and arginine residues in nuclear protein functions. *J Biol Chem*. 1981; **256**(18): 9612-21

Calton BA, Lacey JV Jr, Schatzkin A *et al.*: Physical activity and the risk of colon cancer among women: a prospective cohort study (United States).

Int J Cancer 2006; **119**(2): 385-91

Carlioni V, Mazzocca A, Ravichandran KS: Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Onkogen* 2004; **23**(8): 1566-74

Cheng SH, Ng MH, Lau KM *et al.*: 4q loss is potentially an important genetic event in MM tumorigenesis: identification of a tumor suppressor gene regulated by a promoter methylation at 4q13.3, platelet factor 4. *Blood* 2007; **109**(5): 2089-99

Classen M, Diehl V, Kochsiek K *et al.*: Innere Medizin.

Urban & Fischer 2004.

Creyghton MP, Roel G, Eichhorn PJ, *et al.*: PR72, a novel regulator of Wnt signaling required for Naked cuticle function. *Genes Dev.* 2005; **19**(3): 376-86

Cross AJ, Pollock JR, Bingham SA: Haem, not protein or anorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat.

Cancer Res. 2003; **63**: 2358-60

De Haan JB, Gevers W, Parker MI: Effects of sodiu butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts.

Cancer Res. 1986; **46**(2): 713-6

De Gramont A: Adjuvant therapy of stage II and III colon cancer.

Semin Oncol. 2005; **32** (6 Suppl 8): 11-4

De Gramont A, Tournigand C, Andre T *et al.*: Targeted agents for adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol.* 2006; **33**: 42-5

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, *et al.* Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1998; **95**:14863-8.

Emenacker NJ, Calaf GM *et al.* : Short-Chain Fatty Acids Inhibit Invasive Human Colon Cancer by Modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, Mutant p53, BCL-2, Bax, p21 and PCNA Protein Expression in an In Vitro Cell Culture Model.

American Society for Nutritional Sciences 2001; **01**: 3041-8

Entin-Meer M, Rephaeli A *et al.*: Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. *Mol Cancer Ther.* 2005; **4**: 1952-61

Eyler CE, Telen MJ: The Lutheran glycoprotein: a multifunctional adhesion receptor.

Transfusion 2006; **46**(4): 668-77

Flood A, Velie EM, Sinha R *et al.* : Meat, fat, and their subtypes as risk factors for colorectal cancer in a prospective cohort of women. *Am J Epidemiol* 2003; **158**: 59-68

Frey UH, Alakus H, Wohlschlager J *et al.* : GNAS1 T393C polymorphism and survival in patients with sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; **11**(4): 5071-7

Fu P, Thompson JA, Leeding KS *et al.* : Insulin-like growth factors induce apoptosis as well as proliferation in LIM1215 colon cancer cells.
J Cell Biochem. 2007; **100**(1): 58-68

Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A: Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res.* 2005; **49**(6): 601-8

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und Robert-Koch-Institut (RKI). *Krebs in Deutschland* 2006

Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME *et al.*: Frequent death-associated protein-kinase promoter hypermethylation in brain metastases of solid tumors.
Oncol Rep. 2003; **10**(4): 1031-3

Hayashi H, Matsuzaki O *et al.* : Centaurin- α_1 Is a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Activator of ERK 1/2 Mitogen-activated Protein Kinase.
The Journal of Biological Chemistry 2006; **281**:1332-7

Hayes JJ, Hansen JC: Nucleosomes and the chromatin fiber.
Curr Opin Genet. 2001; **11** (2): 124-9

Henderson NC, Collis EA, Mackinnon AC *et al.* : CD98hc (SLC3A2) Interaction with β_1 Integrins Is Required for Transformation.
The Journal of Biological Chemistry 2004; **279**(52): 54731-41

Hildmann C: Funktionelle Charakterisierung bakterieller Histondeacetylase-ähnlicher Amidohydrolasen (HDAH).

Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen 2004

Iwasaki T, Nakagawa K *et al.* : Hepatoma-derived growth factor as a prognostic maker in completely resected non-small-cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005; **13**(6): 1075-80

Kameue C, Tsukahara T *et al.* : Alteration of Gene Expression in the Colon of Colorectal Cancer Model Rat by Dietary Sodium Gluconate.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006; **70**(3): 606-14

Katan-Khaykovich Y, Struhl K: Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes Dev.* 2002; **16**(6): 743-52

Kinzler KW, Vogelstein B. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective. *American Institute for Cancer Research* 1997; **87**:159-70

Kim HJ, Lee SM, Choi NK *et al.*: Smoking and colorectal cancer risk in the Korean elderly. *J Prev Med Pub Health.* 2006; **39**(2): 123-9

Kitahara O, Furukawa J, Tanaka T *et al.*: Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res.* 2001; **61**(9): 3544-9

Klagsbrun M, Sasse J *et al.* : Human tumor cells synthesize an endothelial cell growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor.

Proc. Natl. Acad. Sci 1986; **83**: 2448-52

Knudsen S: Analysis of DNA Microarray Data.

Wiley-Liss 2002

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C *et al.* : Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 2005; **22**(1): 25-30

Kritchevsky D: Epidemiology of fibre, resistant starch and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev.* 1995; 4(5): 345-52

Kune G, Waston L: Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E selenium, and lycopene. *Nutr Cancer.* 2006; **56**(1): 11-21

Kullmann F: Carcinogenesis and hereditart colon cancers. *Internist (Berl).* 2003; **44**(3): 254-255, 258-67

Landais I, Lee H, Lu H: Coupling caspase cleavage and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of SSRP1 during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006; **13**(11): 1866-78

Lepourcelet M, Tou, L *et al.* Insights into developmental mechanisma and cancers in the mammalian intestine derived from serialanalysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *The company of Biologists* 2005; **132**:415-27

Li J, Tan M, Pamarthy D *et al.*: SAK, a new polo-like kinase, is transcriptionally repressed by p53 and induces apoptosis upon RNAi silencing. *Neoplasia* 2005; **7**(4): 3123-323

Li Y, DeFatta R *et al.*: A translationally regulated Tousled kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed. *Oncogene* 2001; **20**: 726

Liang P, Nair JR *et al.* : Comparative genomic analysis reveals a novel mitochondrial isoform of human rTS protein and unusual phylogenetic distribution of the rTS gene. *BMC Genomics* 2005; **6**:125

Link KH, Sagban TA, Morschel M *et al.*: Colon cancer: survival after curative surgery. *Langenbecks Arch Surg.* 2005; **390**(2): 83-93

Linseisen J, Kesse E, Slimani N *et al.* : Meat consumption in the European Prospective into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts: results from 24-hour dietary recalls. *Public Health Nutr.* 2002; **5**: 1243-58

Lipscomb EA, Mercurio AM: Mobilization and activation of a signaling competent alpha6beta4 integrin underlies its contribution to carcinoma progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; **24**(3): 413-23

Maaser K, Grabowski P, Sutter AP *et al.* : Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer. *Clinic Cancer Res.* 2002; **8**(10): 3205-9

Machuy N, Thiede B *et al.* : A Global Approach Combining Proteome Analysis and Phenotypic Screening with RNA Interference Yields Novel Apoptosis Regulators. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005; **4**: 44-55

Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. Genetic Reprogramming in Pathways of Colonic Cell Maturation Induced by Short Chain Fatty Acids: Comparison with Trichostatin A, Sulindac, and Curcumin and Implications for Chemoprevention of Colon Cancer. *Cancer Research* 2000; **60**:4561-72.

Martinez C, Garcia-Martin E, M.Ladero J *et al.*: Association of CYP2C9 genotypes leading to high enzyme activity and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 2001; **22**(8): 1323-6

Mashkova TD, Oparina NI, Zinoveva OL *et al.*: Transcription TIMP3, DAPk1 and AKR1B10 genes in squamous cell lung cancer. *Mol Biol (Mosk).* 2006; **40**(6): 1047-54
Matsumine A, Senda T *et al.* : MCC, a Cytoplasmic Protein That Blocks Cell Cycle Progression from the G0/G1 to S Phase. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; **271**: 10342-6

Matsuyama A, Inoue H. *et al.* : Hepatoma-derived Growth Factor Is Associated with Reduced Sensitivity to Irradiation in Esophageal Cancer. *Cancer Res.* 2001; **61**: 5714-7

Menssen A, Hermeking H: Characterization of the c-MYC regulated transcription by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes.
Proc Natl Acad Sci. 2002; **99**(9): 6274-9

Menzel T, Melcher R *et al.* Establishment of a colonic adenoma cell line (GEKI-2): spectral karyotype analysis and functional characterization.
Int. J. Colorectal Dis. 2004; **19**(1): 12-7

Menzel T, Schaubert J *et al.* Butyrate and aspirin in combination have an enhanced effect on apoptosis in human colorectal cancer cells.
Eur J Cancer Prev. 2002; **11**:271-81

Miller SJ : Cellular and physiological effects of short-chain fatty acids.
Mini Rev Med Chem. 2004; **4**(8): 839-45

Moschos SJ, Mantzoros CS: The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 2002; **63**(4): 317-32

Moskal A, Norat T, Ferrari P *et al.*: Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies.
Int J Cancer. 2007; **120**(3): 664-71

Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP: Wild type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression.
Cancer Res. 1995; **55**(24): 6161-5

Munshi A, Kurland JF *et al.* : Histone Deacetylase Inhibitors Radiosensitize Human Melanoma Cells by Suppressing DNA Repair Activity.
Clinical Cancer Research 2005; **11**(13): 4912-22

Nemoto T, Hori H, Yoshimoto M *et al.* : Overexpression of ornithine decarboxylase enhances endothelial proliferation by suppressing endostatin expression.

Blood 2002; 99(4): 1478-81

Nikiforov MA, Chandriani S *et al.* : TRRAP-Dependent and TRRAP-Independent Transcriptional Activation by Myc Family Oncoproteins.

Molecular and Cellular Biology 2002; 22(14): 5054-63

Nikitina T, Shi X, Ghosh RP *et al.*: Multiple modes of interaction between the methylated DNA binding protein MeCP2 and chromatin. *Mol Cell Biol.* 2007; 27 (3): 864-77

Nikolopoulos SN, Blaikie P, Yoshioka T *et al.*: Integrin beta4 signaling promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004; 6(5): 471-83

Norat T, Lukanova A, Ferrari P *et al.*: Meat consumption and colorectal cancer risk: dose response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* 2002; 98: 241-56

Norat T, Bingham S, Ferrari P *et al.*: Meat, fish and colorectal cancer Risk: The European Prospective Investigation into cancer and nutrition.

Journal of the National Cancer Institute 2005; 97: 906-16

Norton KS, McClusky D *et al.*: TLK 1B is elevated with eIF4E overexpression in Breast Cancer. *Journal of Surgical Research* 2004; 116: 98-103

Notarnicola M, Messa C, Cavallini A *et al.* : Higher farnesyl diphosphate synthase activity in human colorectal cancer inhibition of cellular apoptosis.

Oncology 2004; 67(5-6): 351-8

Okino K, Konishi H, Doi D *et al.*: Up-regulation of growth factor receptor-bound protein 10 in cervical squamous cell. *Oncol Rep.* 2005; 13(6): 1069-74

Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D *et al.*: Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies.

JAMA 2005; 294(22): 2904-6

Pati D, Zhang N, Plon SE: Linking sister chromatid cohesion and apoptosis: role of RAD21. *Mol Cell Biol.* 2002; **22**(23): 8267-77

Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, *et al.* Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 2005; **26**: 1064-76.

Porkka, Tammela TL, Vessella RL *et al.*: RAD21 and KIAA0196 at 8q24 are amplified and overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004; **39**(1): 1-10

Ragione FD, Criniti V, Pietra VD *et al.* Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Letters* 2001; **499**: 199-204.

Robert F, Hardy S *et al.* TRRAP associates with the MRN Repair Complex and Plays a Role in DNA Double-Strand Break Repair.
Molecular and Cellular Biology 2006; **26.2**: 402-12

Russo GL, Della Pietra V, Mercurio C *et al.*: Protective effects of butyrate acid in colon cancer. *Adv Exp Med Biol.* 1999; **472**:131-41

Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Pereira E *et al.* : Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. *Mutat Res.* 2003; **544**: 403-13

Sandhu MS, White IR, McPherson K *et al.* : Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001, **10**: 439-46

Schauber J, Svanholm C, Termen S *et al.*: Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short-chain fatty acids in colonocyte: relevance of signalling pathways. *Gut* 2003; **52**(5): 735-41

Scheppach W, Bartram HP *et al.* Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1995; **31A**: 1077-80

Sealy L, Chalkley R: The effect of sodium butyrate on histone modification.

Cell 1978; **14**(1): 115-21

Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Lawman Z *et al.* : Expression of methionine aminopeptidase 2, N-myristoyltransferase, and N- myristoyltransferase inhibitor protein 71 in HT29. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **322**(3): 1012-7

Shaughnessy J: Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology* 2005; **10** Suppl 1: 117-26

Sillje HHW, Sillje T *et al.* : Mammalian homologues of the plant Tousled gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication. *EMBO J* 1999; **18**: 569-12

Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M *et al.*: Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation / differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression.

Gut 2000; **46**: 507-14

Sokal RR, Michener CD:

Univ. Kans. Sci. Bull. 1958; **38**: 1409-38

Souleimani A, Asselin C: Regulation of c-myc expression by sodium butyrate in the colon carcinoma cell line Caco-2.

FEBS Lett. 1993; **326**(1-3): 45-50

Spada A, Lania A, Mantovani G: Hormonal Signaling and Pituitary Adenomas.

Neuroendocrinology 2007; ...

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Todesursachen in Deutschland, 2005.

Strammiello R, Benini S, Manara MC *et al.* : Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenetic properties of Ewing`s sarcoma cells.

Horm Metab Res. 2003; **35**(11-12): 675-84

Sugimura T: Nutrition and dietary carcinogens.

Carcinogenesis 2000; 21: 387-95

Sunavala-Dossabhoy G., Balakrishnan SK *et al.* : The radioresistance kinase TLK1B protects the cells by promoting repair of double strand breaks.

BMC Molecular Biology 2005; **6**: 19

Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M *et al.* : Macrophages and angiogenesis.

J Leukoc Biol. 1994; **55**(3): 410-22

Turner BM: Cellular memory and the histone code.

Cell 2002; **111**(3): 285-91

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR *et al.*: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988; **319**: 525-32

Wei EK, Giovannucci E, Wu E *et al.* : Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 2004; **108**: 433-42

Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA *et al.*: Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women.

N Engl J Med. 1990; **323**: 1664-72

Willett WC: Balancing life-style and genomics research for disease prevention.

Science 2002; **296**: 695-8

Xiao R, Badger TM, Simmen FA: Dietary exposure to soy or whey proteins alter colonic global gene expression profiles during rat colon tumorigenesis.

Mol. Cancer 2005; **11**: 4

Yamanoto S, Tomita Y *et al.* : Expression of Hepatoma-Derived Growth Factor Is Correlated with Lymph Node Metastasis and Prognosis of Gastric Carcinoma.

Clinical Cancer Research 2006; **12**: 117-22

Yoshida K, Tomita Y *et al.* : Hepatoma-Derived Growth Factor Is a Novel Prognostic Factor for Hepatocellular Carcinoma.

Annals of Surgical Oncology 2006; **13**(2): 159-67

Yu LL, Yu HG, Yu JP *et al.* : Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue.

World J Gastroenterol. 2004; **10**(22): 3255-60

Zbankova S, Bryndova J, Kment M *et al.*: Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in colorectal cancer.

Cancer Lett. 2004; **210**(1): 95-100

Zhao P, Mao X, Talbot IC: Aberrant cytological localization of p16 and CDK4 in colorectal epithelia in the normal adenoma carcinoma sequence.

World J Gastroenterol. 2006; **12**(39): 6391-6

Zimmermann U, Balabanov S, Giebel J *et al.*: Increased expression and altered location of annexin IV in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumour dissemination.

Cancer Lett. 2004; **209**(1): 111-8

Zou TT, Selaru FM, Xu Y *et al.* Application of cDNA microarrays a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon.

Oncogene 2002; **21**: 4855-62.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach, der mir diese Dissertation erst ermöglichte, sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Melcher für die geduldige Betreuung und Unterstützung.

Weiter möchte ich allen Doctores des Gastrolabors für ihre Hilfe und guten Ratschläge danken, insbesondere Herrn Dr. med. Jürgen Schaubert sowie den Drs. Theodor Kudlich und Frank Weiler.

Nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich den Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Gastrolabors, Frau Kerstin Backhaus, Gerda Dusel, Elisabeth Kelber und Donata Kuhn, welche mir bei den experimentellen Arbeiten mit Rat und Tat zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Tilman Alexander Neun
geboren am 04.04.1979 in Crailsheim
evangelisch, unverheiratet, keine Kinder
Vater: Richter, Mutter: Hausfrau

Schulbildung:

1985-1989: Grundschule Ellwangen
1989-Juni 1998: Gymnasium Ellwangen

Bundeswehr:

September 1998-Juni 1999:
Grundausbildung in Horb am Neckar
Sanitätsdienst der Bundeswehr in Ellwangen, eingesetzt als Truppenarztschreiber

Hochschulstudium:

2000-2006: Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
März 2002: Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
März 2003: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
September 2005: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
November 2006: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

Berufstätigkeit:

seit 15. Juli 2007:
Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für radiologische Diagnostik am Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Würzburg, Februar 2010