

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

**Modulation apoptose- und zellzyklusregulierender
Faktoren in Kolonkarzinomzellen durch Butyrat und
Acetylsalicylsäure**

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

Florian Kreth
aus Leipzig

Würzburg, März 2003

Referent: Prof. Dr. med. W. Scheppach
Koreferent: Prof. Dr. med. W. Timmermann
Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Februar 2004

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms durch Acetylsalicylsäure	4
1.3	Ballaststoffe und Butyrat	6
1.4	Apoptose	7
1.5	Zellzyklus.	10
1.6	p53 und c-fos	12
1.7	Ziele der vorliegenden Dissertation	13
2.	Material und Methoden	
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Chemikalien-Zusammensetzungen (Kits)	15
2.1.4	Chemikalien	16
2.1.5	Radiochemikalien	17
2.1.6	Enzyme	17
2.1.7	Antikörper	18
2.1.8	Größenmarker	18
2.1.9	Standardlösungen	18
2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellkultur	18
2.2.2	RNA-Isolierung	21
2.2.3	cDNA Expression Array	22
2.2.4	RNase Protection Assay	26
2.2.5	Western Blot	29
2.2.6	Zellzyklusanalyse	32
3.	Ergebnisse	
3.1	RNA-Integrität und DNA-Kontamination	34
3.2	Differentielle mRNA Expression durch Butyrat	35

3.3	Modulation von Faktoren der Apoptosekontrolle durch Butyrat und Acetylsalicylsäure	38
3.3.1	p53	38
3.3.2	c-fos	38
3.3.3	Bcl-2-Familie	39
3.4	Modulation von Faktoren der Zellzykluskontrolle durch Butyrat und Acetylsalicylsäure	40
3.4.1	CDK1-3	40
3.4.2	CDK4	40
3.4.3	PISSLRE (CDK10)	41
3.4.4	p16	41
3.4.5	p21	42
3.4.6	p27	44
3.4.7	GADD45	44
3.5	Effekte von Butyrat und Acetylsalicylsäure auf die Zellzyklusphasen	45
3.5.1	Butyrat	45
3.5.2	Acetylsalicylsäure	46
3.5.3	Acetylsalicylsäure und Butyrat in Kombination	47
4.	Diskussion	
4.1	Differentielle Genexpression durch Butyrat	48
4.2	Butyrat und apoptose- und zellzyklusregulierende Faktoren	55
4.3	Acetylsalicylsäure und apoptose- und zellzyklusregulierende Faktoren	61
4.4	Die Kombination aus Acetylsalicylsäure und Butyrat	64
5.	Ausblick	66
6.	Zusammenfassung	68
7.	Abkürzungsverzeichnis	70
8.	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms liegt in Deutschland bei etwa 25 pro 100000 Einwohner pro Jahr und ist bei Männern und Frauen etwa gleich hoch. Damit ist das kolorektale Karzinom das dritthäufigste Karzinom beim Mann und das zweithäufigste bei der Frau. Bei beiden Geschlechtern stellt das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Todesursache dar. Der Manifestationsgipfel liegt im 6. und 7. Lebensjahrzehnt (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002). Das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, liegt zeitlebens bei etwa 6% (Sandler 1996).

Obwohl über 85% aller kolorektalen Karzinome sporadisch auftreten, haben Untersuchungen bei familiären kolorektalen Tumoren wesentliche allgemeine Erkenntnisse zur Kolonkarzinogenese beigetragen.

Die autosomal-dominant vererbte Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) ist für etwa 1% der Kolonkarzinome verantwortlich. Die FAP wird durch eine heterozygote Keimbahnmutation des APC-Tumorsuppressorgens charakterisiert. Die Inaktivierung des zweiten Allels erfolgt durch eine somatische Mutation. Die Tumorsuppressor-Funktion des APC-Gens ist im wesentlichen auf die Regulierung des Wnt/Wg-Signalweges über β -Catenin zurückzuführen. APC bildet mit GSK-3 β , Axin und β -Catenin einen Komplex, der zu einer Phosphorylierung und nachfolgender Degradierung von β -Catenin durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg führt. Mutationen im APC-Gen führen zu erhöhten β -Catenin-Spiegeln im Cytoplasma. β -Catenin transloziert in den Zellkern und bindet an den Transkriptionsfaktor TCF-4. Hierdurch kommt es zu einer Expressionssteigerung von Faktoren, die eine Rolle bei der Proliferation und Transformation von Kolonzellen spielen, wie z.B. c-myc, Cyclin D1, PPAR- δ und c-jun. 70% aller sporadischen Kolonkarzinome besitzen Mutationen im APC-Gen (Chung 2000).

Das Hereditäre Nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC) kommt in 3-6% aller Kolonkarzinome vor und wird ebenfalls autosomal-dominant vererbt. Hierbei kommt es zu Mutationen in DNA-Mismatch-Reparaturgenen (hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1, hPMS2). Nahezu alle Tumoren von HNPCC-Patienten weisen eine

Mikrosatelliteninstabilität (Insertionen oder Deletionen in repetitiven DNA-Sequenzen) auf. Diese Mikrosatelliteninstabilität ist mit Mutationen (Bax, TGF β -Rezeptor Typ II, CDX2, E2F-4, TCF-4) in kodierenden DNA-Sequenzen assoziiert. Auch sporadische Kolonkarzinome zeigen in bis zu 15% eine Mikrosatelliteninstabilität (Chung 2000). Sporadische Kolonkarzinome entstehen aus Adenomen durch eine Serie von somatischen Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen. Dieser Verlauf wurde 1990 erstmals durch Fearon und Vogelstein beschrieben („Adenom-Karzinom-Sequenz“; Fearon und Vogelstein 1990).

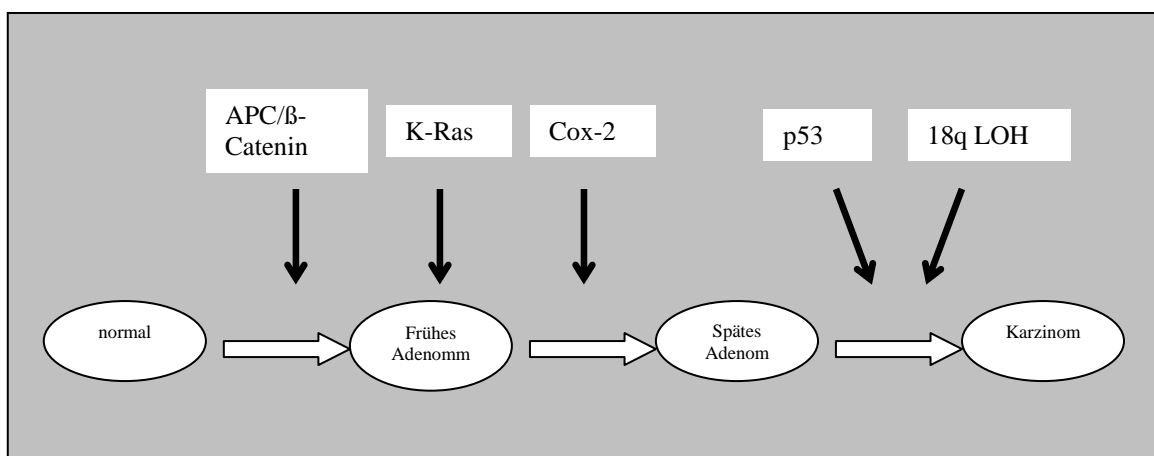


Abb. 1: Wichtige genetische Alterationen während der Adenom-Karzinom-Sequenz.

Dabei werden genetische Veränderungen im APC-Gen bereits bei den frühesten Alterationen in der Adenom-Karzinom-Sequenz gefunden. K-Ras-Mutationen finden sich in etwa 50% der kolorektalen Karzinome. Inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 können in mehr als 50% der kolorektalen Karzinome als spätes Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz nachgewiesen werden. Mehr als 70% aller Tumore zeigen einen 18q-Allelverlust (LOH) und damit einen Verlust der potentiellen Tumorsuppressorgene SMAD2, SMAD4 und DCC.

Desweiteren spielen aber auch epigenetische Phänomene eine Rolle. So wird die Expression von Tumorsuppressorgenen wie p16 durch eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion supprimiert. Cox-2 ist in 43% der Adenome und 86% der Karzinome überexprimiert (Eberhart et al. 1994).

Das kolorektale Karzinom entsteht in der Regel aus einem Adenom („Adenom-Karzinom-Sequenz“), wobei hier die Größe (< 1cm: 1-2% Karzinomrisiko; >2cm: 40-

50% Karzinomrisiko) und der histologische Typ (tubuläres Adenom: 5%; villöses Adenom 40%) für das Karzinomrisiko eine wichtige Rolle spielen.

Vergleicht man die Inzidenz zwischen Industrie- und Entwicklungsländern, so findet sich eine Korrelation zwischen Ernährungsfaktoren und dem kolorektalen Karzinom. So wurde in epidemiologischen Studien der Zusammenhang zwischen Alkohol (Potter et al. 1982), Rauchen, fettreicher Ernährung oder rotem Fleisch (Willett et al. 1990) und dem Auftreten von Kolonkarzinomen beschrieben. Ein protektiver Effekt ist für eine Ernährung beschrieben, die reich an Obst, Gemüse und Ballaststoffen ist (Trock et al. 1990).

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

Tab. 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.

Der Tumor wächst langsam und kann für Jahre klinisch stumm bleiben. Befindungsstörungen können in Folge einer Anämie auftreten und äußern sich in Müdigkeit, Schwäche und Atemnot. Zudem kann es zu Änderungen der Stuhlbeschaffenheit (Wechsel von Obstipation und Diarrhoe; Blutbeimengung) kommen. Zur Früherkennung wird der Patient rektal untersucht, und der Stuhl auf okkultes Blut getestet. Diagnostisches Mittel der Wahl ist aber die Koloskopie. Kolorektale Karzinome sind zu 60% im Rektum und zu 20% im Sigma lokalisiert. Therapeutisch wird der Tumor radikal reseziert. Als Standardchemotherapie (adjuvant im Stadium UICC III, palliativ im Stadium UICC IV) gilt noch 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Folinsäure, Kombinationsschemata mit Irinotecan oder Oxaliplatin sowie orale 5-FU-Prodrugs stellen eine wirksame Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten dar (Büchtele et al. 2000).

Die 5-Jahres-Überlebensrate des kolorektalen Karzinoms (alle Stadien) liegt durchschnittlich bei etwa 50%.

Um die Mortalität des kolorektalen Karzinoms zu senken, bedarf es der Früherkennung. Randomisierte Studien zeigen, daß ein routinemäßiges Screening durch Testung auf okkultes Blut oder durch Sigmoidoskopie die Mortalität des kolorektalen Karzinoms senkt (Kronborg et al. 1996, Selby et al. 1992). Die Vorsorge-Koloskopie bei Patienten ab einem Alter von 55 Jahren ist seit neuesten Bestandteil der Leistungen der gesetzlichen Krankenversicherung in Deutschland. Eine mögliche Alternative zur Senkung der Inzidenz und Mortalität könnte die Primärprävention mittels einer gesunden Ernährung oder durch Pharmakotherapeutika darstellen.

1.2 Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms durch Acetylsalicylsäure

Viele epidemiologische Studien lassen vermuten, daß Acetylsalicylsäure (ASS) eine Rolle bei der Chemoprävention des kolorektalen Karzinoms einnimmt (Tab. 2).

Autor	Größe (Fälle/Kontrollen)	Endpunkt	Relatives Risiko
<i>Fall-Kontroll-Studien:</i>			
Martinez et al. 1995	157/480	Adenome	0,54
Sandler et al. 1998	88/153	Adenome	0,36
Muller et al. 1994	12304/49216	Karzinome	0,5
Kune et al. 1988	715/727	Karzinome	0,7
<i>Kohortenstudien:</i>			
Giovannucci et al. 1994	10521	Adenome	0,65
Giovannucci et al. 1995	89446	Adenome	0,56
Thun et al. 1991	662424	Mortalität (Kolon-Ca)	0,58
Giovannucci et al. 1994	47900	Karzinome	0,74

Tab. 2: Ausgewählte epidemiologische Studien zur Prävention von kolorektalen Karzinomen durch Acetylsalicylsäure.

Obwohl die Datenlage in Bezug auf die Einnahmedauer bzw. -häufigkeit und Dosierung von Acetylsalicylsäure unvollständig ist, kann zusammenfassend gesagt werden, daß Acetylsalicylsäure mehr als zehn Jahre und in einer Dosierung von >80mg/d

eingenommen werden muß, um eine Wirkung auf Inzidenz und Mortalität zu haben (Muir und Logan 1999). Auch andere nichtsteroidale Antirheumatika (nonsteroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) wie Sulindac (Giardiello et al. 1993) oder Cyclooxygenase 2-spezifische Antiphlogistika wie Celecoxib (Steinbach et al. 2000) haben einen positiven Effekt auf die Verhinderung kolorektaler Tumore.

Im Tierversuch konnten Li et al. zeigen, daß Acetylsalicylsäure protektiv auf die Entstehung von Tumorstufen sowie Tumoren in Ratten wirkt (Li, H. et al. 1999). Barnes und Warwick konnten an Mäusen mit einem mutierten APC-Allel (Min (multiple intestinal neoplasia)-Maus) zeigen, daß Acetylsalicylsäure die Tumormasse und Anzahl der Tumoren gegenüber einer Vergleichspopulation erniedrigt (Barnes und Warwick 1998).

Auch *in vitro*-Versuche an Kolonkarzinomzelllinien zeigen, daß Acetylsalicylsäure und andere NSAIDs das Wachstum dieser Zellen verringern, Apoptose auslösen und den Differenzierungsgrad der Zellen erhöhen (Elder et al. 1996, Qiao et al. 1998, Ricchi et al. 1997, Schiff et al. 1996).

Als potentieller Wirkmechanismus wird die Hemmung der Cyclooxygenase (Cox) angesehen. Das Enzym Cyclooxygenase spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese der Prostaglandine. Es katalysiert den Schritt von der Arachidonsäure über Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂, dem Vorläufermolekül für Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxan A₂. Es sind zwei Cyclooxygenase-Isoformen bekannt. Die konstitutive Form Cox-1 ist für Thrombozytenaggregation, Protektion der Magenschleimhaut und renalen Blutfluß wichtig. Cox-2 wird hingegen bei entzündlichen Prozessen, Fieber und Schmerz induziert. Acetylsalicylsäure hemmt unselektiv Cox-1 und Cox-2 und wirkt antiinflammatorisch, antiphlogistisch und analgetisch. Die Nebenwirkungen von Acetylsalicylsäure (gastrointestinale Ulzera, Blutungen, Nierenschäden) werden überwiegend der Hemmung der Cox-1 zugeschrieben (Smith et al. 1996).

Der Cyclooxygenase-2 sowie den Prostaglandinen wird darüber hinaus eine Rolle bei der Kolonkarzinogenese zugeschrieben. Patienten mit kolorektalen Adenomen oder Karzinomen haben erhöhte Prostaglandin E₂-Spiegel im Vergleich zur Normalbevölkerung (Pugh und Thomas 1994, Rigas et al. 1993). Auch die Cyclooxygenase-2 wird in Kolonkarzinomen vermehrt exprimiert (Eberhart et al. 1994, Hao et al. 1999, Sano et al. 1995). DuBois et al. konnten zeigen, daß die Cox-2-Spiegel

auch in karzinogeninduzierten Tumoren bei Ratten erhöht sind (DuBois et al. 1996). Mäuse, bei denen die Funktion des APC-Gens ausgeschaltet war, entwickelten weniger Polypen nach Hemmung der Cyclooxygenase-2 (Oshima et al. 1996). Überexpression von Cox-2 in humanen Kolonkarzinomzellen führt zu einer erhöhten Malignität und Invasivität der Zellen (Tsujii et al. 1997, 1998).

Daneben gibt es Hinweise auf zusätzliche Cox-unabhängige proliferationshemmende Wirkungen. NSAIDs ohne Cox-2-inhibitorische Komponente besitzen eine antiproliferative Wirkung auf Kolonkarzinomzellen, zudem hemmen NSAIDs das Wachstum von Kolonkarzinomzellen, die keine Cox-Aktivität besitzen (Piazza et al. 1995, Elder et al. 1997).

1.3 Ballaststoffe und Butyrat

Unter Ballaststoffen versteht man Kohlenhydrate (Nicht-Stärke-Polysaccharide, Oligosaccharide) sowie Lignin, die nach Nahrungsaufnahme nicht resorbiert werden und bis in das Kolon gelangen.

1971 beschrieb Denis Burkitt erstmals den Zusammenhang zwischen einer niedrigeren Inzidenz des kolorektalen Karzinoms und einer ballaststoffreichen Ernährung bei Afrikanern (Burkitt 1971). Metaanalysen von epidemiologischen Fall-Kontroll-Studien zeigen, daß eine ballaststoffreiche Ernährung mit einem verminderten Risiko assoziiert ist, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln (Howe et al. 1992, Trock et al. 1990). Auch wenn prospektive Studien diesen Zusammenhang bis jetzt nicht bestätigen konnten (Alberts et al. 2000, Fuchs et al. 1999, Schatzkin et al. 2000), bleibt ausreichend Evidenz für eine protektive Ballaststoffwirkung. Ballaststoffe haben viele potentiell karzinoprotektive Effekte im Kolon, wie z.B. die Erhöhung des Stuhlgewichtes, Verringerung der Transitzeit, Verringerung der Konzentration sekundärer Gallensäuren und potentieller Kanzerogene, Erniedrigung des pH-Wertes und Veränderung der Mikroflora (McIntyre et al. 1993). Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Entstehung von kurzkettigen Fettsäuren. Sie entstehen im Kolon durch anaerobe bakterielle Fermentation von Ballaststoffen. Die wichtigsten kurzkettigen Fettsäuren sind Azetat, Propionat und Butyrat, die im Verhältnis von etwa 60:25:15 gebildet werden (Cummings et al. 1987). Insgesamt entstehen sie in einer Konzentration von etwa 100mmol/l pro Tag (Scheppach et al. 1995).

Butyrat ist die bevorzugte Energiequelle für Kolonozyten (Roediger 1980) und stimuliert *in vivo* das Zellwachstum (Scheppach et al. 1992). Dieses Zellwachstum stellt ein physiologisches Wachstum dar, das die basalen 60% einer Kolonkrypte betrifft (Scheppach et al. 1995). Im Gegensatz dazu hemmt Butyrat *in vitro* das Wachstum von Kolonkarzinomzelllinien, induziert Apoptose und erhöht den Differenzierungsgrad der Zellen (Hague et al. 1993, Hague und Paraskeva 1995, Heerdt et al. 1994, Whitehead et al. 1986). *In vivo*-Beobachtungen bekräftigen die mögliche positive Rolle von Butyrat zur Prävention des kolorektalen Karzinoms. Die fäkalen Butyratspiegel und die Tumormasse korrelierten negativ bei Ratten, die mit einer kohlenhydratreichen Nahrung gefüttert wurden (McIntyre et al. 1993). Weizenreiche Nahrung erhöht in Ratten, denen mit Azoxymethan Kolontumoren induziert wurden, den fäkalen Butyratspiegel, senkt die Proliferation, induziert Apoptose und verringert die Zahl von Tumorstufen (Compher et al. 1999). Bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen finden sich ein erniedrigter fäkaler Butyratanteil an den kurzkettigen Fettsäuren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Weaver et al. 1988).

1.4 Apoptose

Apoptose ist ein systemisch und genetisch programmierter Prozeß, der eine bedeutende Rolle bei Gewebehomostase und Zelldifferenzierung spielt. Apoptose (Programmierter Zelltod) ist wichtig für die Embryogenese, bei der Elimination von nicht-funktionstüchtigen oder abnormalen Zellen, aber auch bei der Ätiologie von viralen Infektionen, neurodegenerativen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Karzinomen.

Während eine Nekrose meist eine Zellgruppe betrifft und mit einer Entzündungsreaktion einhergeht, verläuft die Apoptose spezifisch an einzelnen Zellen, die ohne Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes von Makrophagen phagozytiert werden. Typische morphologische Veränderungen der apoptotischen Zellen sind Zellschrumpfung, zytoplasmatische Bläschenbildung, Formation von apoptotischen Körpern, Kondensation und Fragmentierung des Nukleus (Granville et al. 1998).

Der molekularbiologische Transduktionsweg der Apoptose ist komplex und wird im Folgenden zusammenfassend dargestellt (s. Abb. 2).

Apoptose kann durch eine Reihe verschiedener extrazellulärer Stimuli ausgelöst werden.

Der Fas-Ligand (Fas-L) induziert Apoptose, indem es an seinen Rezeptor Fas (Apo-1, CD95) bindet und die Fas-associated death domain (FADD) aktiviert. FADD wiederum assoziiert mit der Proenzymform von Caspase-8.

Ähnlich wie der Fas-Signalweg wird die Apoptoseinduktion durch den Tumornekrosefaktor (TNF) vermittelt. Nach Bindung von TNF an den Rezeptor TNF-R1 wird über ein Adapterprotein (TRADD: TNF-receptor-associated death domain) FADD aktiviert und an Pro-Caspase-8 gebunden.

In beiden Systemen bewirkt dieser Komplex eine Aktivierung von Caspase-8. Diese Aktivierung wird durch FLICE inhibitory proteins (FLIP) gehemmt. Caspase-8 aktiviert Caspase-3, die letztendlich über eine Spaltung verschiedener Substrate im Nukleus die Apoptose der Zelle bewirkt.

Bei der durch Granzyme B vermittelten Apoptose wird Caspase-3 entweder direkt oder über die Aktivierung von Caspase-10 aktiviert (Granville et al. 1998).

Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Caspase-3 spielt das Mitochondrium. Nach Freisetzung von Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und unter Anwesenheit von Cytochrom C und dATP, aktiviert Apaf-1 Caspase-9, die dann Caspase-3 spaltet und aktiviert. Neben anti-apoptotischen Faktoren (u.a. bcl-2, bcl-x₁, mcl-1, bcl-w) kontrollieren auch pro-apoptotische Mitglieder der bcl-2-Familie (u.a. bax, bik, bak, bad, bid, bcl-x_s) den Apoptoseablauf am Mitochondrium. Diese Faktoren bilden Homo- oder Heterodimere, die sich in ihrer Wirkung aufheben oder verstärken. Anti-apoptotische Faktoren der bcl-2-Familie (bcl-2, bcl-x₁) hemmen Apaf-1 und damit die Aktivierung von Caspase-3 (Li, P. et al. 1997, Pan et al. 1998). Pro-apoptotische Faktoren wie Bik können Apaf-1 von den Apoptose-Inhibitoren lösen (Chinnaiyan et al. 1997). Bcl-2 und bcl-x₁ bilden Poren in der Mitochondrienmembran und kontrollieren so den Membrantransport (Reed 1997). Kluck et al. konnten zeigen, daß bcl-2 die Zellen vor Apoptose schützt, indem die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium verhindert wird (Kluck et al. 1997). Bcl-x₁ hemmt direkt Cytochrom C und verringert so den intrazellulären Spiegel von Cytochrom C (Kharbanda et al. 1997). Unabhängig von der Caspasen-Kaskade kann bax durch Ionenkanalbildung und Mitochondrienzerstörung Apoptose auslösen (Green und Reed 1998).

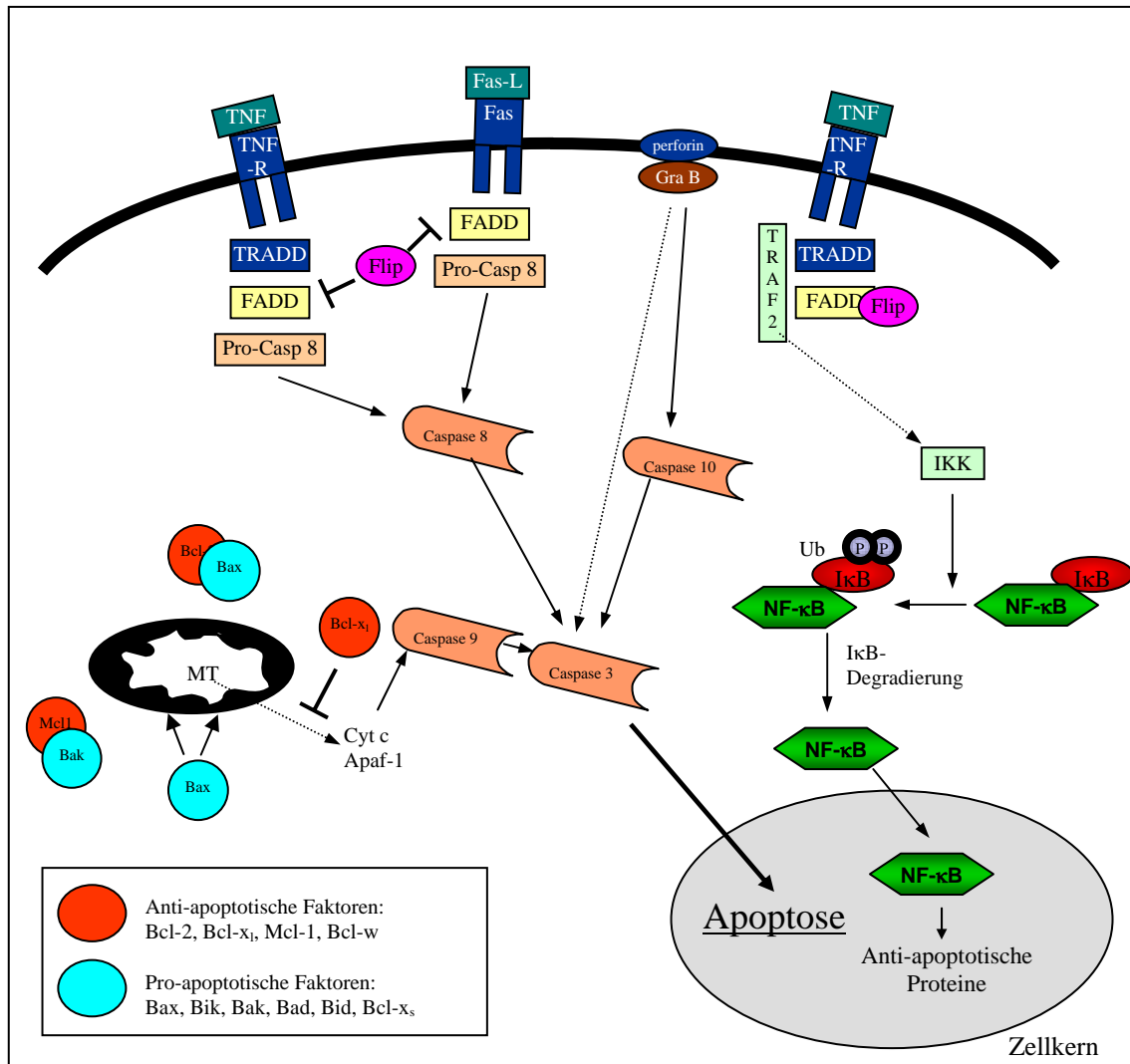


Abb. 2: Apoptoseinduktion und -modulation (s. Text).

Neben dem apoptotischen Weg über die Caspasenaktivierung hat TNF die Möglichkeit anti-apoptotisch zu wirken. Über TRAF2 (TNF receptor-associated factor-2) und NIK (NF- κ B-inducing kinase) wird die I κ B-Kinase (IKK) aktiviert. IKK phosphoryliert I κ B α (inhibitory protein κ B α), das hierauf ubiquitiniert und degradiert wird und so den Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor- κ B) aus der Bindung entläßt. NF- κ B transloziert in den Nukleus und induziert die Transkription von anti-apoptotischen Faktoren (Beg und Baltimore 1996, Abb. 2).

Kolonepithelzellen unterliegen einem ständigen Turnover. Neue Zellen entstehen aus Stammzellen, die an der Kryptenbasis lokalisiert sind. Diese Zellen differenzieren während der Migration zum Kolonlumen zu mukosalen Epithelzellen (3-7 Tage). Schließlich gehen die Zellen an der Schleimhautoberfläche in Apoptose (Podolsky und

Babyatesky 1995). Zellen, die näher an der Kryptenoberfläche liegen, weisen eine größere bak-Expression auf (Moss et al. 1996). In kolorektalen Tumoren ist neben einer erhöhten Proliferation auch die Apoptoseinduktion der Zellen gestört. So nimmt der Anteil der apoptotischen Zellen von benignen Polypen zum invasiven Karzinom ab (Bedi et al. 1995). Krajewska et al. konnten zeigen, daß in kolorektalen Karzinomen bak reduziert und bcl-x₁ erhöht vorliegt (Krajewska et al. 1996). Auch das anti-apoptotische Protein bcl-2, das in normaler Schleimhaut nur in der basalen Kryptenhälfte auftritt, ist in kolorektalen Karzinomen überexprimiert (Flohil et al. 1996).

1.5 Zellzyklus

Unter Zellzyklus werden die Vorgänge zwischen zwei Zellteilungen (Mitosen) verstanden. Alle vier Phasen des Zellzyklus, M (Mitose), G₁ (Gap 1), S (DNA-Synthese) und G₂ (Gap 2) sind exakt reguliert. Der Zellzyklus der menschlichen Zelle wird durch Aktivierung bzw. Inaktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinases; CDK) gesteuert. Die Aktivierung erfordert die Bindung von regulatorischen Proteinen, den Cyclinen. Die Integrität der zellulären DNA wird während des Voranschreitens der Zelle durch die einzelnen Phasen des Zellzyklus vor allem an zwei Kontrollpunkten (G₁/S- sowie G₂/M-Übergang) kontrolliert. Der Übergang von der frühen in die mittlere G₁-Phase hängt von der CDK4- und CDK6-Aktivität ab, die von drei D-Cyclinen (D1, D2, D3) reguliert wird. Dabei phosphoryliert der aktive Cyclin D-CDK4-Komplex das Retinoblastom-Protein (Rb), das so den Transkriptionsfaktor E2F freigibt, der die Transkription wichtiger DNA-Synthese-Produkte induziert. Den Übergang und das Voranschreiten durch die S-Phase wird durch CDK2 bestimmt, die mit den Cyclinen E und A Komplexe bildet. CDK1 (cdc2) wird durch das Cyclin B aktiviert und bewirkt den Übergang von der G₂- in die M-Phase. Neben der Bildung der Cyclin-CDK-Komplexe ist für die Aktivierung der CDK außerdem die Phosphorylierung durch eine CDK-activating Kinase (CAK: CDK7 + Cyclin H) notwendig (Morgan 1995, 1997; Abb. 3).

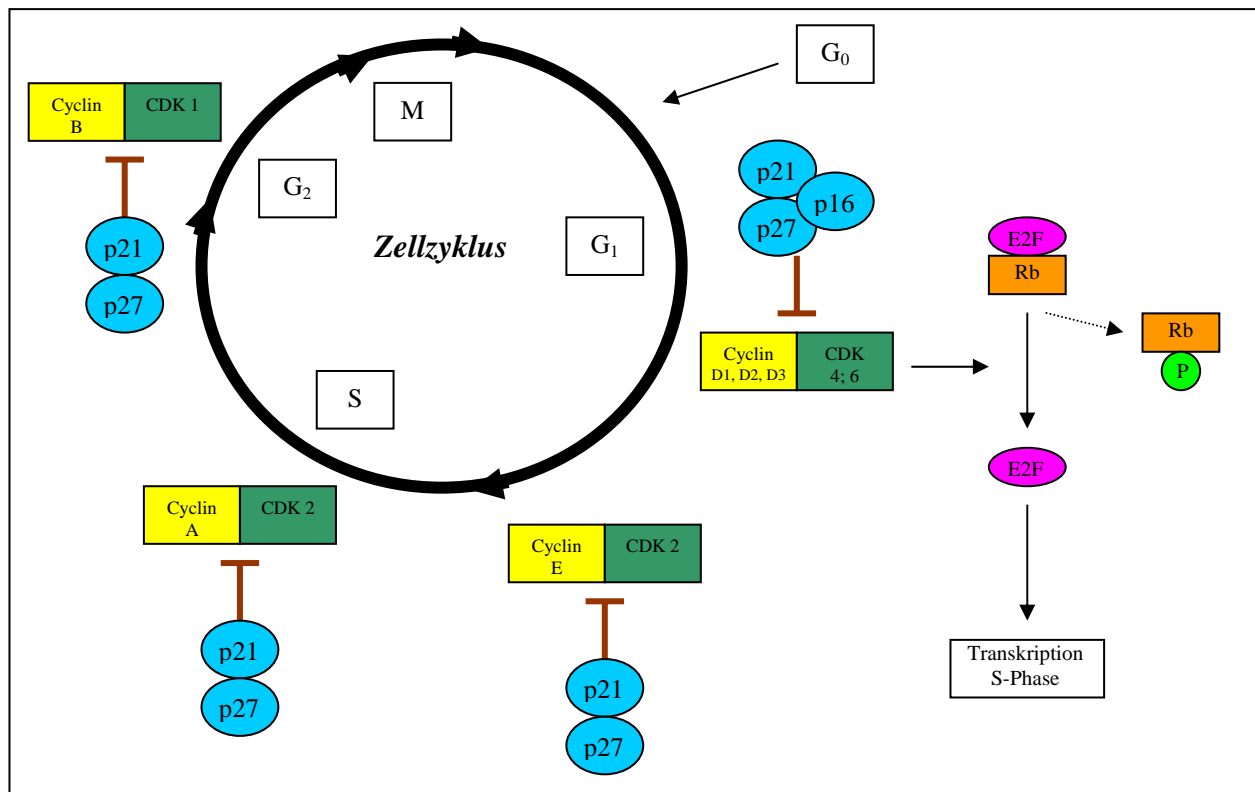


Abb. 3: Zellzykluskontrolle (s. Text).

Die CDK-Aktivität wird durch Bindung von CDK-Inhibitoren verhindert. Zwei Familien von CDK-Inhibitoren wurden bisher beschrieben. Die Ink 4-Familie besteht aus $p15^{\text{INK4b}}$, $p16^{\text{INK4a}}$, $p18^{\text{INK4c}}$ und $p19^{\text{INK4d}}$ und inhibiert selektiv die Aktivität von CDK4 und CDK6, während die Mitglieder der zweiten Familie $p21^{\text{waf1/cip1}}$, $p27^{\text{kip1}}$ und $p57^{\text{kip2}}$ universale CDK-Inhibitoren sind (Sherr und Roberts 1999).

Der Prototyp dieser Gruppe, p21 (Xiong et al. 1993) hemmt unabhängig von Cyclin-abhängigen Kinasen auch PCNA (proliferating cell nuclear antigen), das für die DNA-Replikation notwendig ist. p21 ist ein durch das Tumorsuppressorgen p53 regulierter Faktor (El-Deiry et al. 1995). Andere Untersuchungen zeigen aber auch, daß p21 unabhängig von p53 induziert werden kann (Sheikh et al. 1997, Steinman et al. 1994).

Verschiedene Gruppen beschrieben neue cdc2-ähnliche Proteine, die aufgrund ihrer Homologie zur cdc2-PSTAIRE-Aminosäurenregion benannt wurden (Meyerson et al. 1992). PISSLRE (CDK10) scheint dabei essentiell für das Zellwachstum in der G₂/M-

Phase zu sein (Li, S. et al. 1995). Eine aktuelle Arbeit konnte eine Interaktion von CDK10 mit dem Transkriptionsfaktor Ets2 nachweisen (Kasten und Giordano 2001).

GADD45 ist ein von p53 reguliertes Protein, das bei Überexpression die Zellproliferation hemmt. Es konnte gezeigt werden, daß GADD45 die Aktivität des Cyclin B-CDK1-Komplex inhibiert und so für die Kontrolle des G₂/M-Überganges wichtig sein könnte (Zhan et al. 1999).

Abweichungen in der Zellzykluskontrolle führen zu unkontrollierter Zellproliferation und gehören zu den häufigsten Veränderungen in Tumorzellen.

Die Kolonkarzinogenese ist mit Mutationen oder Abnormalitäten von zellzyklus-regulierenden Faktoren assoziiert. Cyclin D1 und Cyclin E sind in Kolonkarzinomen häufig überexprimiert (Arber et al. 1996, Batkova et al. 1994, Weinstein 2000). Auch CDK1, CDK2 sowie CDK4 werden abnormal hoch exprimiert (Yamamoto et al. 1995, Zhang et al. 1997). CDK-Inhibitoren dagegen liegen in kolorektalen Karzinomen entweder inaktiviert vor (p16), oder deren erniedrigte Expression ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (p21; p27) (Dai et al. 2000, Holland et al. 2001, Sgambato et al. 2000).

1.6 p53 und c-fos

p53 ist ein Tumorsuppressorgen, das eine wichtige Rolle bei Zellzyklusarrest, Apoptose, Integrität des Genoms und DNA-Reparaturmechanismen einnimmt (Agarwal et al. 1998). p53 kann durch äußere Stimuli wie oxidativer Streß, Hypoxie oder Chemotherapeutika aktiviert werden. Bei DNA-Schäden wird p53 induziert und bewirkt entweder Zellzyklusarrest oder Apoptose. Es ist als Transkriptionsfaktor in der Lage, eine Reihe von Genen zu aktivieren (p21, GADD45, mdm2, Cyclin G, bax, IGF-BP3; Ko und Prives 1996). In ca. 50-70% aller kolorektalen Tumore liegt p53 mutiert vor (Chung 2000). Dieses mutierte p53 ist dann nicht mehr in der Lage, Zellzyklusarrest oder Apoptose auszulösen (Michalovitz et al. 1990). Darüber hinaus besitzt das mutierte p53 maligne Eigenschaften, indem es den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil verschafft (Dittmer et al. 1993).

Der Transkriptionsfaktor c-fos dimerisiert mit c-jun und bildet den Transkriptionskomplex AP-1, der die Expression von Genen induziert, die in

Zellproliferation und -differenzierung involviert sind. Die Expression von c-fos korreliert dabei mit dem Differenzierungsgrad der Zellen (Bohmann et al. 1987).

1.7 Ziele der vorliegenden Dissertation

Von unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß sich Acetylsalicylsäure und Butyrat in ihrer Wirkung auf Kolonkarzinomzellen verstärken. Werden HT-29 und Caco-2 Zellen mit einer Kombination aus Acetylsalicylsäure und Butyrat inkubiert, proliferieren die Zellen deutlich langsamer als nach Inkubation mit Butyrat und Acetylsalicylsäure alleine. Auch der Anteil der apoptotischen Zellen ist unter Inkubation mit der Kombination im Vergleich zur Inkubation mit den Einzelsubstanzen deutlich größer (Menzel et al. 2002). Unabhängig davon konnten Crew et al. zeigen, daß eine Kombination aus NS 398, einem spezifischen Cox-2-Inhibitor, und Butyrat additive Effekte auf das Wachstum von Kolonkarzinomzellen hat (Crew et al. 2000). Die genauen molekularen Mechanismen dieser Wirkverstärkung von Butyrat und Acetylsalicylsäure sind noch nicht bekannt.

In dieser Arbeit sollten zunächst molekularbiologische Methoden (RNase Protection Assay, cDNA Expression Array) für mRNA-Expressionsuntersuchungen etabliert werden.

Nach Inkubation von HT-29 Kolonkarzinomzellen mit Butyrat und Acetylsalicylsäure sowie in Kombination wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Untersuchung der differentiellen mRNA-Expression durch Butyrat mittels eines cDNA Expression Arrays.
- Untersuchungen zur Modulation der Expression von Faktoren der Zellzyklus- und Apoptosekontrolle durch Acetylsalicylsäure und Butyrat.
- Untersuchungen zur Modulation der Zellzyklusphasen durch Acetylsalicylsäure und Butyrat.
- Untersuchungen zu potentiell additiven oder synergistischen Wirkungen von Acetylsalicylsäure und Butyrat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Fedegari, Italien
Blottingkammer Mini Trans-Blot Modul	BioRad, Hercules CA, USA
Brutschrank B5060	Hereus, Hanau
Elektrophoresekammern	
Mini Protein II Cell	BioRad, Hercules CA, USA
Easy-cast Horizontal Electrophoresis System 7x8cm	MWG-Biotech, Ebersberg
FACSscan	Becton Dickinson, San Jose CA, USA
Filmentwicklungsautomat	Protec Gerätebau GmbH, Oberstenfeld
Flüssigkeitsszintillationszähler	Cranberra Packard, Dreieck
Gefrierschrank	
-70°C	Thermo forma, Marietta OH, USA
-20°C	Bosch, Stuttgart
Heizblöcke	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Hybridisierungsflaschen	MWG-Biotech, Ebersberg
Hybridisierungsöfen	Hereus, Hanau
Mikroskop Leitz DM IL	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Philips, Hamburg
N ₂ -Behälter	Taylor-Wharton, Husum
Neubauerzählkammer Bright Line 10µl	Schott Glas, Mainz
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer	
Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Tecan-Spektra-Spektroskop	Tecan, Crailsheim
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipettboy acu	Integra Bioscience GmbH, Fernwald
Power Supplies	
Power Pac 200	BioRad, Hercules CA, USA
EC-Apparatus EC140	EC-Apparatus Co., Holbrook NY, USA
EPS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg
Quarzküvette 100µl	Hellma, Müllheim
Rüttler IKA-Vibrax-VXR	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
Sterilwerkbank Gelaire BSB 4	Bioflow Technik, Meckenheim
Thermocycler GenAmp® PCR-System 9700	PE Applied Systems, Rottgau-Jüngersheim
Ultraschall Sonoplus HM70	Bandelin, Berlin
UV-Tisch TI3 (312nm)	Biometra, Göttingen
Videodokumentationssystem Biometra	Biometra, Göttingen
Biodoc	
Vortexer „Vortex Genie 2“	Bender & Hohbein AG, Zürich, CH
Waage	Sauter, Albstadt-Ebingen

Analysenwaage	Mettler Toledo, Gießen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen	
Labofuge 400R	Kendro, Hanau
Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Hettich 2020	Hettich, Tuttlingen
Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Frischhaltefolie	Cofresco, Minden
Blottingpapier GB 002	Schleicher & Schnell, Keene NH, USA
Membranen	
Nylonmembran BrightStar-Plus™	Ambion, TX, USA
PVDF-Immobilionmembran	Milipore, Bedford MA, USA
Röntgenfilm Hyperfilm™ ECL™	Amersham Bioscience, Freiburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	
1,7ml Safe Seal Microcentrifuge Tubes	Sörenson Bio Science, West Salt Lake City UT, USA
15, 50ml	Falcon, Heidelberg
Kulturflaschen (25, 75cm ²)	Costar, Cambridge MA, USA

2.1.3 Chemikalien-Zusammensetzungen (Kits)

QIAshredder	Quiagen, Hilden
Atlas Human 1.2 Array	Clontech, Palo Alto CA, USA
4 Atlas Array Membranen	
10x dNTP Mix	
CDS Primer Mix	
5x Reaction Buffer	
DTT	
MMLV Reverse Transcriptase	
10x Termination Mix	
ExpressHyb™ Hybridisation Solution	
C ₀ t-1 DNA	
Atlas NucleoSpin Extraction Kit	
dH ₂ O	
ECL-Detection System	Amersham Life Science Ltd., Little Chalfont, UK
hCC-1 Multi-Probe Template Set	Pharmingen, San Diego CA, USA
hStress-1 Multi-Probe Template Set	Pharmingen, San Diego CA, USA
In Vitro Transcription Kit	Pharmingen, San Diego CA, USA
RNasin	
DTT	
5x Transcription Buffer	
T ₇ RNA Polymerase	
RNase-freie DNase	
20mM EDTA	

Yeast RNA	
Ammoniumacetat	
Nonisotopic Detection Kit	Ambion, TX, USA
5x Wash Buffer	
10x Blocking Buffer	
Streptavidin-Alkaline Phosphatase	
10x Assay Buffer	
CDP-Star	
RiboQuant	Pharmingen, San Diego CA, USA
Ammoniumacetat	
Hybridisation Buffer	
RNase Buffer	
RNase A+T ₁ Mix	
Proteinase K Buffer	
Proteinase K	
Yeast t-RNA	
1x Loading Buffer	
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden
Buffer RLT	
Buffer RW1	
Buffer RPE	
RNase-free H ₂ O	

2.1.4 Chemikalien

Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acrylamid	Boehringer, Manheim
Acrylamid-Bisacrylamid (19:1)	Boehringer, Manheim
Agarose MS	Boehringer, Manheim
Ammoniumacetat	Pharmingen, San Diego CA, USA
Biotin RNA Labeling Mix	Boehringer, Manheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA Fraktion V	Boehringer, Manheim
Butyrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dNTP	Promega GmbH, Mannheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA 0,5M pH 8.0	Gibco BRL, Eggenstein
EGTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	J.T.Baker, VA Deuter, Holland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Bovines Serum (FBS)	Life Technologies, Paisly, UK
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hepes Buffer	Life Technologies, Paisly, UK
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

L-Glutamin	Life Technologies, Paisly, UK
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Minimal Essential Medium	Life Technologies, Paisly, UK
MOPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Na ₃ Citrat 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
NaF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH 2M	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Non Essentiell Amino Acids	Life Technologies, Paisly, UK
PBS Dulbecco's	Life Technologies, Paisly, UK
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Paisly, UK
Phenol pH 4.3, Tris-saturated	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PMSF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pyronin Y	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sheared salmon testes DNA (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sodiumacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trockenmilchpulver	Fluka-Biochemika, Buchs, CH
Trypanblau	Life Technologies, Paisly, UK
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Urea	Merck, Darmstadt

2.1.5 Radiochemikalien

[α -P ³²]dATP (10 μ Ci/ μ l)	Amersham, Little Chalfont, UK
--	-------------------------------

2.1.6 Enzyme

Trypsin/EDTA 1%	Life Technologies, Paisly, UK
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNase I (5U/ μ l)	Boehringer Mannheim
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Taq-Polymerase (5U/ μ l)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
DNase-freie RNase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.7 Antikörper

Anti-CDK4 (goat)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p21 (mouse)	Transduction Laboratories, Lexington, GB
Anti-p27 (mouse)	Transduction Laboratories, Lexington, GB
Anti-Goat IgG (RαG), Merrettichperoxidase-gekoppelt (HRP)	Amersham, Little Chalfont, UK
Anti-Mouse IgG (SαM), Merrettichperoxidase-gekoppelt (HRP)	Amersham, Little Chalfont, UK

2.1.8 Größenmarker

100bp DNA ladder/5x DNA loading buffer	Promega GmbH, Mannheim
SDS-PAGE Standards	BioRad, Hercules CA, USA

2.1.9 Standardlösungen

DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat (DEPC) 0,05% in ddH ₂ O 12h bei 37°C inkubieren, autoklavieren
-----------------------	---

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinie HT-29

10% FBS-Medium:	1% L-Glutamin
	2% Penicillin/Streptomycin
	1% Non Essential Amino Acids (NEAA)
	0,4% HEPES Buffer
	10% FBS
	in Minimal Essential Medium

Für die molekularbiologischen Versuche wurde die Zelllinie HT-29 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) als *in vitro*-Modell verwendet. Es handelt sich um eine Zelllinie aus einem menschlichen Adenokarzinom des Kolons, die von J. Fogh 1964 etabliert wurde (Fogh 1975). HT-29 Zellen weisen eine mäßige Differenzierung (G2) sowie ein mutiertes p53 auf. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in 10% FBS-Medium in Kultur gehalten. Hierfür wurden 75cm² Zellkulturflaschen verwendet. Das Medium (20ml/Kulturflasche) wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Zur

Fortführung der Zellkultur nach Konfluenz (ca. 40×10^6 Zellen) wurden die adhären wachsenden Zellen durch Trypsin vom Zellkulturboden abgelöst. Hierfür wurden die Zellen kurz mit 5ml PBS gewaschen und 5min bei 37°C mit 3ml Trypsin inkubiert. Durch Resuspension der abgelösten Zellen in 10% FBS-Medium wurde die Trypsinreaktion gestoppt. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in neue 75cm^2 Kulturflaschen gegeben und in 20ml 10% FBS-Medium kultiviert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Suspension mit Trypanblau vermischt, und die Zellen mittels einer Neubauerzählkammer unter dem Inversionsmikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen errechnet sich wie folgt: gezählte Zellen/Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10000. Vitale Zellen stellten sich dabei Trypanblau-negativ dar. Für die Zellkulturversuche wurden Zellen aus der 5.-20. Subpassage verwendet.

2.2.1.2 Ansatz der Zellkulturversuche

Für die nachfolgenden cDNA Expression Array-, RNase Protection Assay- und Western Blot-Versuche wurden 1×10^6 Zellen in 75cm^2 Kulturflaschen ausgesät. Für die Zellzyklusanalyse wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 25cm^2 Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden anschließend für 72h in 20 bzw. 5ml 10% FBS-Medium inkubiert.

2.2.1.3 Synchronisation und Inkubation mit den Testsubstanzen

Um ein synchrones Zellwachstum zu erreichen, wurde nach 72-stündiger Inkubation das 10% FBS-Medium durch serumfreies Medium ersetzt, dem nach 6h wieder Serum zugesetzt wurde. Nach weiteren 12h Inkubation wurden die Zellen mit den zu testenden Substanzen inkubiert. Diese waren Butyrat (1-5mM) und Acetylsalicylsäure (1-5mM) alleine sowie in Kombination (Butyrat 1-3mM/ASS 1mM, Butyrat 2mM/ASS 2mM, Butyrat 1mM/ASS 1-3mM). Butyrat wurde in ddH_2O , Acetylsalicylsäure in Ethanol gelöst. Als Kontrolle wurden die Zellen in 10% FBS-Medium inkubiert. Die Zellen für den cDNA Expression Array wurden für 24h mit den Testsubstanzen behandelt. Für die RNase Protection Assay-Versuche wurden die Zellen für 0, 2, 4, 8 und 24h inkubiert, für die Western Blot- und Zellzyklus-Untersuchungen für 0, 24, 48 und 72h.

2.2.1.4 Aufarbeitung der Zellen (RNase Protection Assay, Western Blot)

Zu den obengenannten Zeitpunkten wurde das Medium abpipettiert und die adhärent wachsenden Zellen mit 5ml bzw. 3ml PBS je nach Kulturflaschengröße ($75\text{cm}^2/25\text{cm}^2$) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5min bei 37°C mit 3ml (1ml) Trypsin inkubiert, um die Zellen vom Kulturflaschenboden abzulösen. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 10% FBS-Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit dem abpipettierten Medium in ein 50ml Gefäß gegeben und nach Entnahme eines Aliquots für die Zellzählung für 10min bei 900rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10ml PBS resuspendiert und für 10min bei 900rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgesaugt, das Zellpellet in 1ml PBS gelöst und in ein silikonisiertes 1,7ml Reaktionsgefäß überführt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 1200rpm und 4°C wurde das Zellpellet in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufbearbeitung gelagert. Die Zellzahl der Zellpellets wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ermittelt (s. 2.2.1.1).

2.2.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Kulturzellen wurde der RNeasy Mini Kit (Quiagen) verwendet. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Das Zellpellet ($5-10 \times 10^6$ Zellen) wurde in 600 μl Lysisbuffer (RLT-Buffer: 1% β -Mercaptoethanol, Guanidinium-Isothiocyanat) vollständig gelöst. Die Lysate wurden zunächst zur Homogenisierung auf eine RNeasy shredder column (Quiagen) aufgetragen und 2min bei RT und 14000rpm zentrifugiert. Die Eluate wurden mit 600 μl 70% Ethanol gemischt, in zwei Schritten auf die mitgelieferten Säulen gegeben und 30s bei RT und 14000rpm zentrifugiert. Diese Methode beruht auf der selektiven Bindung der RNA an eine Silicagelmembran. Die Säulen wurden daraufhin mit 700 μl Buffer RW1 (Guanidinium-Isothiocyanat-haltig) und zweimal mit Buffer RPE (Ethanol-haltig) gewaschen. Zur Eluation wurden zweimal 30 μl DEPC- H_2O aufgetragen und jeweils 1min bei RT und 14000rpm zentrifugiert.

2.2.2.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260nm photometrisch gemessen (Quarzküvette, 1:100 Verdünnung in 100µl Volumen). Dabei entspricht eine E_{260} von 1 ca. 40µg/ml RNA. Zur Beurteilung der RNA-Reinheit wurde zusätzlich die Extinktion bei 280nm gemessen. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} lag bei den zur weiteren Analyse verwendeten Aliquots zwischen 1,6 und 1,8.

2.2.2.3 Formaldehyd/Agarose-Gel zur Bestimmung der RNA-Qualität

10x FA Gel Puffer:	MOPS 200mM Sodiumacetat 50mM EDTA 10mM in DEPC-H ₂ O pH 7.0
1,2% Formaldehyd/Agarose-Gel:	1,2% Agarose 10% 10x FA Gel Puffer in DEPC-H ₂ O in Mikrowelle lösen nach Abkühlen auf ca. 65°C: 1,8% Formaldehyd (37%) 0,5µg/ml Ethidiumbromid
5x RNA Ladepuffer:	16µl Bromphenolblau 80µl 500mM EDTA, pH 8.0 720µl 35% Formaldehyd 2ml Glycerol (100%) 3,084ml Formamid 4ml 10x FA-Gel-Puffer ad 10ml DEPC-H ₂ O
1x FA Gel Loading Puffer:	100ml 10x FA Puffer 20µl Formaldehyd (37%) ad 1l DEPC-H ₂ O

Um die Qualität der isolierten RNA zu beurteilen, wurde 1µg RNA auf ein 1,2% Formaldehyd/Agarose-Gel aufgetragen. Hierfür wurden 1,2g Agarose und 10ml 10x FA Gel Puffer mit DEPC-H₂O auf 100ml aufgefüllt und in einer Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig löste. Nach Abkühlen auf 65°C wurden 1,8ml 37% Formaldehyd und 1µl Ethidiumbromid (10mg/ml) hinzugegeben und in eine horizontale Gelkammer gegossen. 1µg RNA wurde mit 5x RNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die RNA wurde bei 100V in 1x FA-Gel Loading Puffer aufgetrennt.

Die RNA-Banden ließen sich aufgrund der Interaktion von Ethidiumbromid mit der RNA bei UV-Licht (312nm) visualisieren. Als Gütekriterium der RNA wurde die scharfe Detektion der ribosomalen RNA-Untereinheiten 28S und 18S im Verhältnis 1,5-2,5:1 festgelegt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Biodoc, Biometra).

2.2.3 cDNA Expression Array

Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 wurden über 24h mit 4mM Butyrat inkubiert. Als Kontrolle diente die 24-stündige Inkubation mit Medium. Nach RNA-Aufreinigung und cDNA-Synthese mit [α -³²P]dATP-Markierung wurden die Butyrat- sowie die Kontrollprobe mit den 1176 komplementären cDNA-Abschnitten auf einer positiv-geladenen Nylonmembran (Atlas Human 1.2 Array, Clontech; komplette Genliste: <http://www.clontech.com/atlas/genelists>) hybridisiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden die radioaktiv markierten Abschnitte auf einem Röntgenfilm detektiert.

2.2.3.1 DNase Behandlung (nach Clontech)

10x DNase Puffer:	400mM Tris-HCl (pH 7.5) 100mM NaCl 60mM MgCl ₂ in DEPC-H ₂ O
-------------------	---

10x Termination Mix:	0,1M EDTA pH 8.0 in DEPC-H ₂ O
----------------------	--

50µg Gesamt-RNA wurden mit DNase I (5U) in 1x DNase Puffer (Gesamtvolumen 1ml) 30min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen des DNA-Abbaus durch 10µl 10x Termination Mix erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Probenaufreinigung. Hierfür wurden 110µl Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 zur Phasenextraktion zugegeben. Die Suspension wurde bei 14000rpm und 4°C für 10min zentrifugiert, und die obere Phase in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer erneuten Phasenextraktion durch 110µl Chloroform wurde die RNA mittels Ammoniumacetat (10µl) und 95% Ethanol (300µl) präzipitiert. Hierfür wurde die Suspension 30min bei -80°C inkubiert und für 15min bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und dem RNA-Pellet zur weiteren Aufreinigung 80% Ethanol (100µl) zugegeben. Nach fünfminütiger

Zentrifugation wurde wiederum der Überstand abgenommen und die RNA in 10µl DEPC-H₂O gelöst. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1µg Gesamt-RNA auf ein Formaldehyd/Agarose-Gel aufgetragen, um die RNA-Qualität zu beurteilen (s. 2.2.2.3). Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Kontrolle einer DNA-Kontamination durch Polymerase Chain Reaction

10x TBE:	0,9M Tris base 0,9M Borsäure 20mM EDTA in DEPC-H ₂ O
1,5% Agarose-Gel	1,5% Agarose in 1x TBE in Mikrowelle lösen nach Abkühlen auf ca. 65°C: 0,5µg/ml Ethidiumbromid

Um den Erfolg der DNase-Behandlung zu kontrollieren, wurde eine Polymerase Chain Reaction (PCR) durchgeführt. Hierbei wurde ein DNA-Abschnitt (GAPDH) durch eine hitzestabile Taq-Polymerase zwischen synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primer) amplifiziert. Das PCR-Produkt konnte dann nach Auftrennung über ein Agarosegel mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. In die Reaktion wurde 1µg der Gesamt-RNA eingesetzt. Die Taq-Polymerase wurde als letzte Substanz zugesetzt (Tab. 3).

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

Tab. 3: Pipettierschema für die Polymerase Chain Reaction (PCR).

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

Die DNA wurde mittels eines Thermocyclers unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

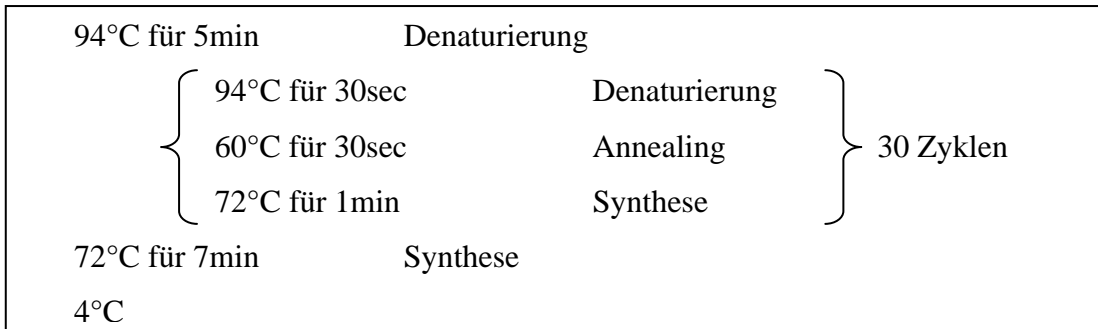


Abb. 4: Zyklenschema für die Polymerase Chain Reaction (PCR).

Der Nachweis des PCR-Produkts (452bp) erfolgte in einem 1,5% Agarose-Gel. Hierfür wurden 1,5g Agarose in 100ml 1x TBE in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf 65°C wurde 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. 5µl des PCR-Produkts wurden mit 1µl 5x DNA loading dye vermischt und auf ein 1,5% Agarosegel geladen. Zusätzlich wurde ein 100bp DNA-Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1x TBE bei 100V für 30min. Die Visualisierung erfolgte durch Detektion des Ethidiumbromids durch UV-Licht.

2.2.3.3 cDNA Synthese

10x Termination Mix	0,1M EDTA pH 8.0 in sterilem H ₂ O
---------------------	--

Der anschließende cDNA Expression Array wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (Clontech, Paolo Alto, USA).

Zu 5µg Gesamt-RNA wurden 1µl eines für die eingesetzte Membran spezifischen CDS Primer Mix, 5x Reaction Buffer (8µl), 10x dNTP Mix (4µl), 100mM DTT (2µl) sowie [α -³²P]dATP (10µl; 3000Ci/mmol) gegeben, und die RNA durch eine MMLV Reverse Transcriptase in 30min bei 50°C zu spezifischer cDNA transkribiert. Die Reaktion

wurde durch Zugabe von 2µl 10x Termination Mix gestoppt. Die mit [α - 32 P] markierte cDNA wurde durch Säulenchromatographie von den nicht eingebauten 32 P-Nukleotiden gereinigt und in sechs verschiedene Fraktionen (je 100µl) aufgeteilt. Die Aktivität wurde anschließend für alle Fraktionen mittels eines Flüssigkeitsszintillationszählers gemessen und hatte ihr Optimum in der zweiten oder dritten Fraktion ($2 \cdot 10^6$ cpm/ml).

2.2.3.4 Hybridisierung der cDNA mit dem AtlasTM Array

10x Denaturation Solution:	1M NaOH 10mM EDTA in sterilem H ₂ O
2x Neutralisation Solution:	1M NaH ₂ PO ₄ pH 7.0 in sterilem H ₂ O
20x SSC:	175g NaCl 88,2g Na ₃ Citrat 2H ₂ O ad 1l steriles H ₂ O pH 7.0
20% SDS:	200g SDS ad 1l steriles H ₂ O bei 65°C lösen
Wash Solution 1:	2x SSC 1% SDS
Wash Solution 2	0,1x SSC 0,5% SDS

Bevor die Proben mit den cDNA-Abschnitten auf der Membran hybridisiert werden konnten, mußte die Membran aktiviert werden. Hierfür wurde die Membran nach kurzem Waschen mit H₂O 30min bei 68°C mit 10ml ExpressHyb/salmon testes DNA (10µg/ml) in Hybridisierungsflaschen unter ständiger Rotation prähybridisiert. Für die Hybridisierung mit den 1176 komplementären cDNA-Abschnitten auf der positiv-geladenen Nylonmembran (Atlas Human 1.2 Array, Clontech) wurde ausschließlich die cDNA aus der zweiten und dritten Fraktion der Säulenchromatographie benutzt. Um die zu untersuchende cDNA vorzubereiten, wurden 200µl der markierten Probe ($2 \cdot 10^6$ cpm/ml) mit 22µl 10x Denaturation Solution vermischt und für 20min bei 68°C

inkubiert. Anschließend wurden 5µl C₀t-1 DNA und 225µl 2x Neutralisation Buffer zugegeben und 10min bei 68°C inkubiert. Diese Lösung wurde mit 5ml ExpressHyb/salmon testes DNA (10µg/ml) gut gemischt und auf die prähybridisierte Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter ständiger Rotation bei 68°C.

Anschließend wurde die Membran dreimal mit auf 68°C vorgewärmter Wash Solution 1 sowie einmal mit vorgewärmter Wash Solution 2 jeweils 30min bei 68°C gewaschen. Danach wurde die Membran kurz auf Filterpapier gelegt, in Plastikfolie verpackt und 1-5 Tage bei -80°C auf Röntgenfilmen belichtet.

2.2.4 RNase Protection Assay

Der RNase Protection Assay wurde nach einer modifizierten Anleitung des Herstellers (RiboQuant, Pharmingen) im Rahmen dieser Arbeit nichtradioaktiv etabliert. Insbesondere die nichtradioaktive Durchführung stellte initial ein beträchtliches methodisches Problem dar. Folgendes Vorgehen erlaubte die Generierung von reproduzierbaren Ergebnissen: Zunächst erfolgte eine Hybridisierung der nichtradioaktiv markierten Sonden (8 Faktoren sowie L32 und GAPDH als „housekeeping genes“; Pharmingen; Tab.4) mit der isolierten RNA. Nach Aufreinigung und Auftrennung dieser hybridisierten RNA-Abschnitte konnten diese semiquantitativ durch einen enzymatischen Nachweis detektiert werden.

2.2.4.1 Generierung und Markierung der Sonden

hSTRESS		hCC-1	
bcl-x ₁	bax	CDK1	p21
p53	bcl-2	CDK2	PISSLRE
GADD45	mcl1	CDK3	p16
c-fos	L32	CDK4	L32
p21	GAPDH	p27	GAPDH

Tab. 4: Verwendete Multi-Probe Template Sets hSTRESS und hCC-1 (Pharmingen).

Im ersten Schritt wurden die Sonden für die Hybridisierung mit Biotin markiert. Hierfür wurden die Multi-Probe Template Sets (hSTRESS-1, hCC-1, Pharmingen) mittels einer

in vitro-Transkription in Antisense-RNA umgeschrieben. Bei dieser Transkription erfolgte der Einbau von biotinylierten UTPs in die synthetisierten RNA-Abschnitte. Dafür wurden 9µl DEPC-H₂O, 1µl RNasin, 2µl DTT, 4µl 5x Transcription Buffer, 1µl T₇ RNA Polymerase (In vitro transcription Kit, Pharmingen) sowie 2µl Biotin RNA Labeling Mix (Boehringer Mannheim) mit 1µl DNA eines Multi-Probe Template Sets vermischt und 1h bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte der Abbau der DNA mittels Zugabe von 2µl DNase und Inkubation bei 37°C für 30min. In den folgenden Schritten wurde die synthetisierte RNA-Sonde durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mit Ethanol gefällt. Nach Zugabe von 26µl 2mM EDTA, Yeast RNA (In vitro transcription Kit, Pharmingen), 25µl Phenol pH 4.3 und 25µl Chloroform:Isoamyl Alkohol 50:1 sowie fünfminütiger Zentrifugation bei 15000 rpm und RT wurde die obere (wässrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Phasentrennung durch 50µl Chloroform:Isoamyl Alkohol 50:1 und Zentrifugation für 2min wurde die Sonde mit 50µl Ammoniumacetat 4M (In vitro transcription Kit, Pharmingen) und 250µl eiskaltem Ethanol vermischt und 30min bei -80°C inkubiert. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C wurde die markierte RNA gefällt. Nach Abpipettieren des Überstands erfolgte ein Waschschriff mit 100µl 90% Ethanol und fünfminütiger Zentrifugation. Danach wurde das RNA-Pellett fast vollständig getrocknet und in 250µl Hybridisation Buffer (RiboQuant, Pharmingen) gelöst. Bis zum Gebrauch wurden die biotinylierten RNA-Sonden bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 RNase Protection Assay

10x TBE	0,9M Tris base 0,9M Borsäure 20mM EDTA in DEPC-H ₂ O
5% Acrylamid/ 8M Urea Gel (30ml)	5% Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 8M Urea in 1x TBE lösen 120µl 10% Ammoniumpersulfat 16 µl TEMED

5µg isolierte Gesamt-RNA wurden mit 50µl Ammoniumacetat und 250µl eiskaltem Ethanol gemischt und nach 30-minütiger Inkubation bei -80°C durch Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C 15min gefällt. Die gefällte RNA wurde dann fast vollständig

getrocknet und in 8µl Hybridisation Buffer gelöst. Zu jeder Probe wurden 2µl der synthetisierten RNA-Sonde gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überdeckt. Die Proben wurden in ein mit 90°C vorgeheiztes Wasserbad gegeben, das dann langsam auf 56°C abkühlen sollte. Bei dieser Temperatur inkubierten die Proben über Nacht (12-16h) zur Hybridisierung der RNA-Sonden mit der isolierten Gesamt-RNA.

Nach abgelaufener Hybridisierung wurden alle nicht-hybridisierten (ungeschützten) RNA-Abschnitte durch eine RNase-Inkubation abgebaut. Hierfür wurden die Proben für 45min bei 30°C mit einem RNase A+T₁ Mix (in RNase Buffer, Riboquant, Pharmingen) inkubiert. Durch eine 15-minütige Inkubation mit einem Proteinase K Cocktail (Riboquant, Pharmingen) bei 37°C wurde die RNase-Reaktion gestoppt. In den folgenden Schritten wurden die hybridisierten RNA-Abschnitte aufgereinigt. Nach Zugabe von 65µl Phenol (pH 4.5) und 65µl Chloroform-Isoamyl Alkohol 50:1 sowie fünfminütiger Zentrifugation bei RT wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Zur Fällung der RNA wurden die Proben nach Zugabe von 120µl Ammoniumacetat 4M und 650µl eiskaltem Ethanol (100%) und 30-minütiger Inkubation bei -80°C zentrifugiert (14000rpm, 4°C, 15min). Nach dem Trocknen der Pellets wurde die RNA in 5µl Loading Buffer (Riboquant, Pharmingen) resuspendiert und vor dem Beladen des Gels für 3min auf 90°C erhitzt und auf Eis gegeben. Zur Auftrennung der Proben wurde ein 5% Acrylamid/ 8M Urea Gel verwendet. Als Kontrolle diente eine mit Loading Buffer 1:750 verdünnte RNA-Sonde. Die Gel-Elektrophorese lief bei 200V 45min in 1x TBE-Buffer (Mini Protean II Cell, BioRad). Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Transfer der RNA-Abschnitte auf eine positiv geladene Nylonmembran (BrightStar-PlusTM Nylon Membrane, Ambion). Als Puffer wurde 0,5x TBS verwendet. Der Blotvorgang wurde für 5min bei 50mA und für 45min bei 200mA durchgeführt (Mini Trans-Blot Module, BioRad). Nach dem Blotten wurde die RNA auf der Membran durch 2-minütiges UV-Crosslinking immobilisiert ($\lambda=312$, Biometra TI3). Der enzymatische Biotin-Nachweis erfolgte mit dem BrightStarTM Bio DetectTM: Nonisotopic Detection Kit (Ambion). Hierbei wurde die Membran 2x5min in 1x Wash Buffer gewaschen, bevor unspezifische Bindungsstellen mit Blocking Buffer abgedeckt wurden (2x5min, 1x30min). Danach wurde die Membran 30min in einer Conjugate Solution (0,01% Streptavidin-Alkalische Phosphatase in Blocking Buffer) inkubiert. Nach zehnminütiger Inkubation in Blocking

Buffer erfolgte eine dreifache fünfminütige Inkubation in 1x Wash Buffer. Nach Waschen der Membran für 2x2min mit 1x Assay Buffer wurden die Biotin-Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplexe mittels CDP-StarTM nachgewiesen. Die Chemilumineszenz wurde durch lichtempfindliche Filme detektiert.

2.2.5 Western Blot

2.2.5.1 Proteinisolierung und Probenaufbereitung

Lysis Buffer:	20mM Tris-HCl pH 7.4 1mM EGTA 50µM Na ₃ VO ₄ 50mM NaF 0,01U/ml Aprotinin 1µM Phenylmethylsulfonylfourid PMSF 10µg/ml Pepstatin in ddH ₂ O
Stacking Buffer:	0,5mM Trisbase 0,8% SDS 20% 2-Mercaptoethanol in ddH ₂ O
Sample Buffer:	10% Glycerol 4% SDS 0,03% Bromphenolblau 0,2% Pyronin Y in 1x Stacking Buffer

Jedes Zellpellet wurde in 200µl Lysis Buffer durch Vortexen gelöst. Anschließend erfolgte die Lysierung durch zehnssekündige Ultraschallbehandlung (Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin). Die Proben wurden dann 5min bei 4°C und 7500rpm zentrifugiert, und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 750nm mittels eines BioRad DC Protein Assays (BioRad, Hercules CA, USA) gemessen. Als Standardkurve dienten verschiedene Rinderalbuminkonzentrationen (BSA Fraction V, Boehringer Mannheim, Mannheim). Jede Probe wurde mit 70µl Sample Buffer durch Vortexen gemischt, 3min lang bei 95°C erhitzt und 5min auf Eis gekühlt.

2.2.5.2 SDS-PAGE

Running Buffer:	1,5mM Trisbase 0,8% SDS in ddH ₂ O
Stacking Buffer:	0,5mM Trisbase 0,8% SDS 20% 2-Mercaptoethanol in ddH ₂ O
15% Acrylamidgel:	
Running Gel	15% Acrylamid in Running Buffer
Stacking Gel	5% Acrylamid in Stacking Buffer
Elektrophoresepuffer:	0,25M Trisbase 1,92M Glycin 1% SDS in ddH ₂ O
TBS:	10mM Tris-HCl 150mM NaCl in ddH ₂ O

Die Proben (50µg) wurden dann mittels SDS-PAGE (Protean II Cell, BioRad) der Größe nach aufgetrennt. Die Polyacrylamidkonzentration des Geles lag bei 15%. Als Größenmarker wurden in eine Geltasche 10µl eines standardisierten Proteingemisches (SDS-PAGE Standards, BioRad) gegeben.

2.2.5.3 Immunoblotting

TBS	10mM Tris-HCl 150mM NaCl in ddH ₂ O
TBS/0,1% Tween 20	0,1% Tween 20 in TBS
Dry Milk-blocking Buffer	5% Trockenmilchpulver 0,1% Tween 20 0,1% Natriumazid in TBS

Nach Auftrennung der Proben wurde das Proteingemisch auf eine PVDF-Membran (Immobilion-membrane, Milipore, Bedford MA, USA) durch Elektroblothing bei 400mA überführt (Transblot System, BioRad). Um die gleichmäßige Proteinbeladung zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau S für 2min angefärbt. Nach mehrmaligen Waschen der Membran mit ddH₂O konnte die gleichmäßige Proteinladung beurteilt werden. Durch PBS 0,1% Tween 20 wurde die Membran wieder entfärbt.

Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Dry Milk-blocking Puffer über Nacht bei 4°C wurde die Membran in TBS 0,1% Tween 20 (3x30sec, 1x10min) gewaschen. Daraufhin wurde der Primärantikörper aufgetragen und die Membran für 2h inkubiert (s. Tab. 5). Anschließend folgten Waschschrte in TBS 0,1% Tween 20 (3x30sec, 3x15min) und ein weiterer Blockierungsschritt in 5% Dry Milk-blocking Puffer (30min). Nach dem Waschen der Membran in TBS 0,1% Tween 20 (2x30sec, 1x10min) wurde die Membran für 1h mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert (s. Tab. 6). Nach weiteren Waschgängen in TBS 0,1% Tween 20 (3x30sec, 2x15min) wurde der Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Detection System, Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK) nachgewiesen. Bei diesem Nachweis kommt es zu einer HRP-katalysierten Oxidation von Diazylhydrazid und nachfolgender Lichtemittierung. Diese wurde durch die Belichtung von lichtsensitiven Filmen sichtbar gemacht.

Antigen	MW	Art	Verdünnung	Zeit	Positiv-Kontrolle
CDK4	33kD	goat	1:40	2h	HeLa
p21	21kD	mouse	1:250	2h	HeLa
p27	27kD	mouse	1:2500	2h	HeLa

Tab. 5: Primärantikörper.

	2. Antikörper	Verdünnung
CDK4	anti-goat	1:5000
p21	anti-mouse	1:3750
p27	anti-mouse	1:3750

Tab. 6: Sekundärantikörper.

2.2.6 Zellzyklusanalyse

2.2.6.1 Propidiumiodid-Färbung

Propidium Iodid-Lösung: Propidium Iodid 10 μ g/ml
DNase-freie RNase 200 μ g/ml
in PBS

An den verschiedenen Inkubationszeitpunkten wurde das Medium abpipettiert und die adhärent wachsenden Zellen mit 3ml PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen für 5min bei 37°C mit 1ml Trypsin inkubiert, um die Zellen vom Kulturflaschenboden abzulösen. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 10% FBS-Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit dem abpipettierten Medium in ein 15ml Gefäß gegeben und nach Entnahme eines Aliquots für die Zellzählung für 10min bei 900rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5ml PBS resuspendiert und für 10min bei 900rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 5ml PBS. Nach Zentrifugation und Absaugen des PBS wurden die Zellen in einer Konzentration von 1,5x10⁶ Zellen/ml in 70% Ethanol für 12-24h bei -20°C fixiert und permeabilisiert. 1ml der Suspension (1,5x10⁶ Zellen) wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und für 5min bei 1000rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Ethanols wurden die Zellpellets zweimal mit 500 μ l PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben 1h bei Raumtemperatur mit 500 μ l Propidium Iodid-Lösung in Dunkelheit inkubiert.

2.2.6.2 FACScan und Auswertung

Die Proben wurden auf einem FACScan (Beckton Dickinson) mittels Anregung durch einen 488nm-Laser unter Verwendung von Lysis II als Software gemessen. Die Zellpopulation wurde in einem Forward Scatter (FSC) – Sideward Scatter (SSC) - Dot Plot bestimmt, FSC und SSC wurden linear dargestellt. Die Menge des gebundenen Propidiumiodids wurde in FL-3 gemessen. Es wurden bei langsamer Zählrate 10.000 Zellen pro Probe gemessen. Von der Messung ausgeklammert wurden die Regionen mit Zellfragmenten sowie mit Zelldimeren.

Die Daten wurden von HP-Format von Lysis II mittels LIFUTIL (Hewlett-Packard) in eine MS-DOS-Datei umgewandelt. Die Auswertung erfolgte mittels MDI 2.8 (Joseph Trotter) auf einem Windows NT-Rechner. In der Auswertung wurden die

Zellpopulationen wieder im FSC-SSC-Dot Plot dargestellt. So wurde der DNA-Gehalt der Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl dargestellt. Die einzelnen Zellzyklusphasen mit unterschiedlichen DNA-Gehalten konnten markiert und der prozentuale Zellanteil berechnet werden.

2.2.6.3 Statistische Analysen

Zur Berechnung des Signifikanzniveaus der prozentualen Zellanteile der Zellzyklusphasen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test mittels SPSS 11.0 berechnet. Aufgrund der geringen Stichprobengröße (2 Versuche) wurde auf die statistische Auswertung der Werte mit den ASS-Konzentrationen 2 und 5mM sowie den Butyratkonzentrationen 4 und 5mM verzichtet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 RNA-Integrität und DNA-Kontamination

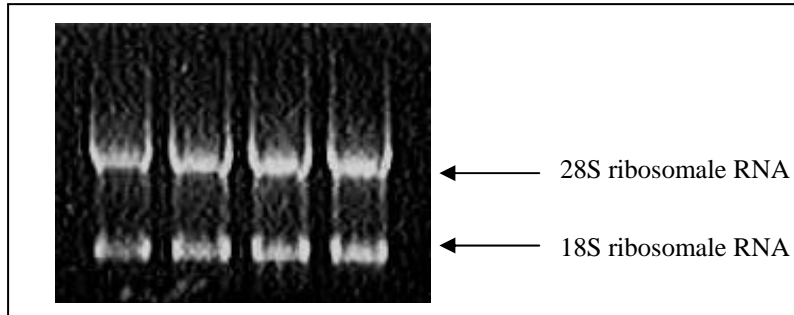


Abb. 5: Prüfung der RNA-Integrität.

Nach der Isolierung der RNA aus den HT-29 Zellen wurde die RNA auf ihre Unversehrtheit mittels einer Formaldehyd/Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung geprüft. Hierbei stellen sich bei erhaltener Integrität die 28S und 18S ribosomalen Banden scharf dar. Die 28S ribosomale Bande ist dabei etwa doppelt so groß wie die 18S Bande (Abb. 5). Um zu testen, ob die isolierte RNA nach DNase-Behandlung noch mit genomischer DNA kontaminiert war, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Bei guter RNA-Reinheit sind keine PCR-Produkte nachweisbar (Abb. 6).

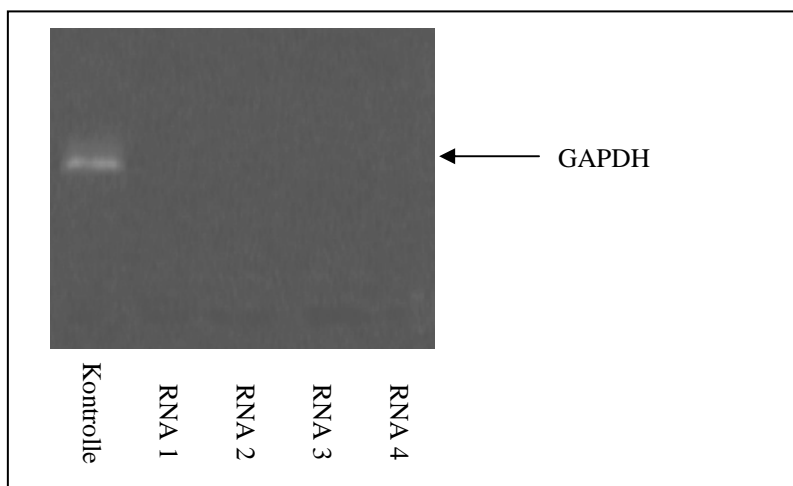


Abb. 6: Polymerase Chain Reaction: Prüfung einer DNA-Kontamination der RNA.

3.2 Differentielle mRNA-Expression durch Butyrat

Im cDNA Expression Array konnten mittels des Atlas Arrays Human 1.2 (Clontech) 41 Faktoren aufgezeigt werden, die in mindestens zwei von drei unabhängigen Versuchen in ihrer Expression durch Butyrat (4mM) deutlich moduliert wurden. Dabei wurde die Expression von 22 Faktoren vermindert (Tab. 7), von 19 Faktoren induziert (Tab. 8). Einen typischen Versuch mit einer Auswahl von Faktoren zeigt exemplarisch die Abbildung 7.

Faktoren
c-myc transcription factor PUF
c-myc
40S ribosomal protein S3A
PISSLRE
Xeroderma pigmentosum group C repair complementing
EGF-response factor 1
ATF-4 (activating transcription factor 4)
YB-1
40S ribosomal protein S19
Tyrosine-protein kinase receptor EPH
Glutathione peroxidase-gastrointestinal
HMG I and J
Integrin beta-4
Neuromedin-B receptor
Bone morphogenetic protein 4
Macrophage colony stimulating factor-1 (M-CSF)
Hepatoma-derived growth factor
Vascular endothelial growth factor (VEGF)
Interleukin-1 beta
Alpha-1-antitrypsin
Proteasome component C3
Monocyte/neutrophil elastase inhibitor

Tab. 7: Faktoren, deren Expression durch Butyrat vermindert wurde.

Faktoren
Cyclin K
Parathymosin
Interleukin-10
Glutathione S-transferase M4
Heat shock protein 86
Heat shock protein 27
Thioredoxin peroxidase 2 (TDPX2)
Natural killer cell enhancing factor b (NKEFB)
Glutathione S-transferase pi (GSTP1; GST3)
Integrin alpha L (CD11a)
CDC28 protein kinase 2
MAP kinase-activated protein kinase 2
Tyrosine kinase TNK1
Neurogranin
Protein kinase C substrate
Defender against cell death 1 (DAD-1)
MLH1
p21
Basic transcription element-binding protein 2 (BTEB2)

Tab. 8: Faktoren, deren Expression durch Butyrat induziert wurde.

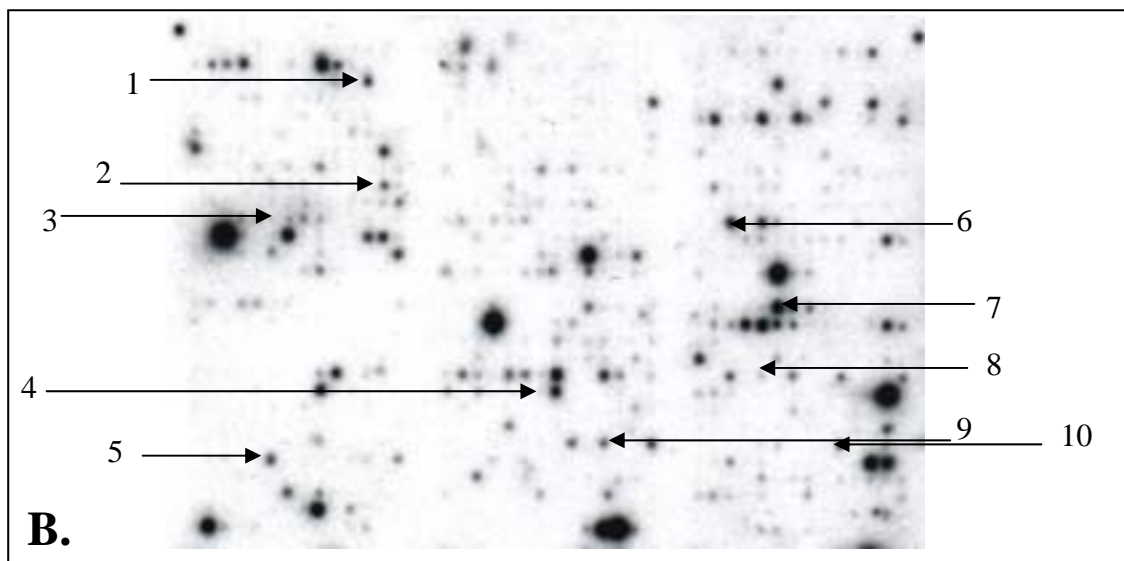
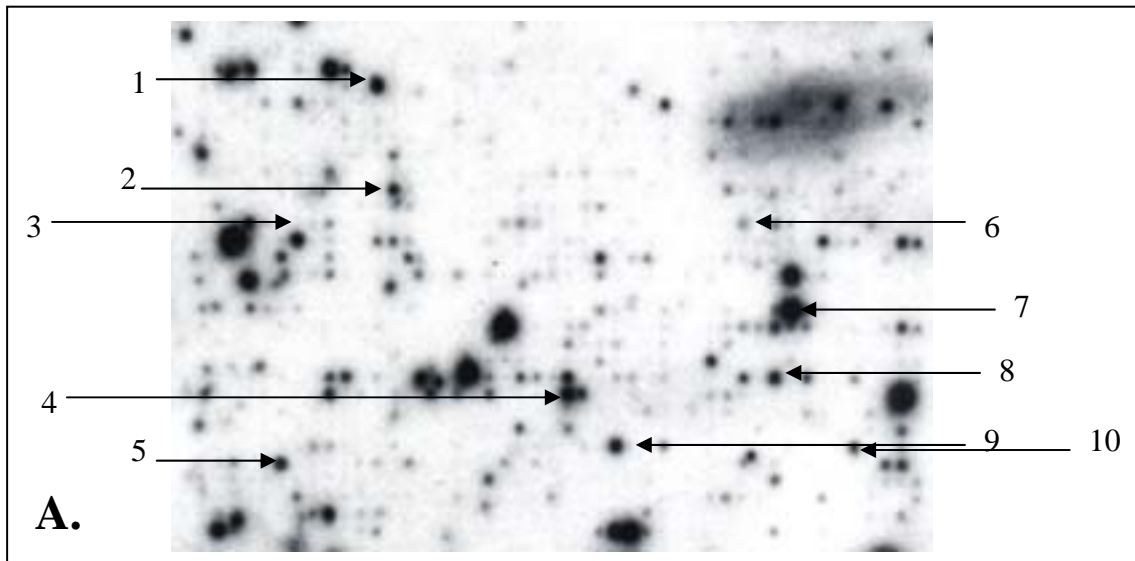


Abb. 7: Atlas Human 1.2 Array

Inkubation von HT-29 Zellen für 24h mit Butyrat 4mM (B.) und unter Kontrollbedingungen (A.).

1	c-myc	6	DAD 1
2	PISSLRE	7	Glutathion peroxidase-gastrointestinal
3	p21	8	Hepatoma-derived growth factor
4	HMG I(Y)	9	Integrin beta-4
5	ERF-1	10	Interleukin 1-beta

3.3 Modulation von Faktoren der Apoptosekontrolle durch Butyrat und Acetylsalicylsäure

Mittels RNase Protection Assay wurden Faktoren untersucht, die bei der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle spielen.

3.3.1 p53

Butyrat reduziert konzentrationsunabhängig die Expression von p53-mRNA nach 8h mit einem Maximum nach 24h (Abb. 8; 9). Acetylsalicylsäure hat keinen Einfluß auf die Expression der p53-mRNA (Abb.8). Unter Inkubation von HT-29 Zellen mit Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombinationen kommt es zu keinem stärkeren p53-mRNA-Suppression als unter Inkubation mit Butyrat alleine.

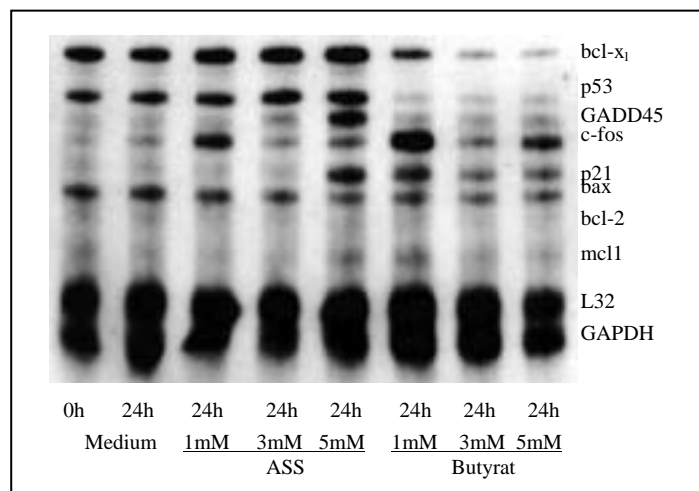


Abb. 8: RNase Protection Assay nach Inkubation von HT-29 Zellen mit ASS und Butyrat.

3.3.2 c-fos

Nach Inkubation von HT-29 Zellen kommt es zu einer Induktion von c-fos nach 2h durch Butyrat (1-5mM) (Abb. 9). Acetylsalicylsäure hat keinen Einfluß auf die c-fos-Expression (Abb. 11). Die Kombination aus Acetylsalicylsäure und Butyrat hat den gleichen Effekt auf die Induktion von c-fos-mRNA wie Butyrat alleine.

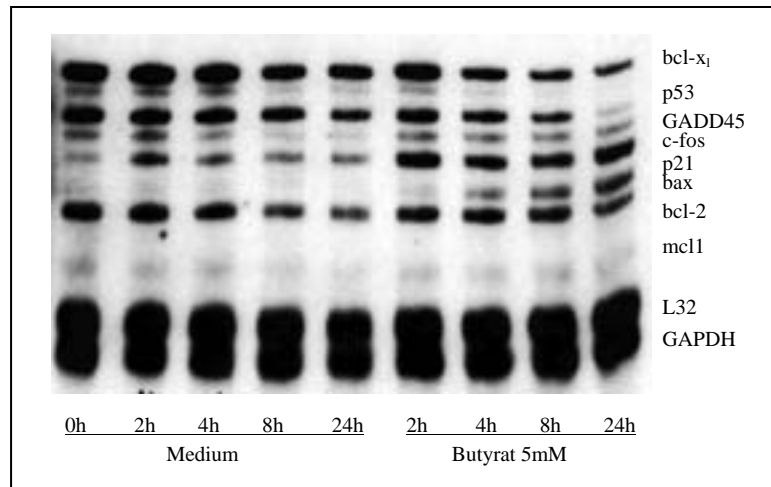


Abb. 9: RNase Protection Assay nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat.

3.3.3 Bcl-2 Familie

Die mRNA-Expression von bax, bcl-2 und mcl1 wird durch Inkubation mit Butyrat, Acetylsalicylsäure sowie der Kombination nicht verändert (Abb. 8-11).

Nach Inkubation der Zellen mit Butyrat kommt es zu einer konzentrationsunabhängigen Reduktion der bcl-x_l-mRNA-Expression nach 8h. Nach 24h zeigt sich hier der größte Effekt (Abb. 8; 9). Acetylsalicylsäure hat keinen Effekt auf die Expression der bcl-x_l-mRNA-Expression (Abb.11). Eine Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombination reduziert die bcl-x_l-mRNA nicht stärker als Butyrat alleine.

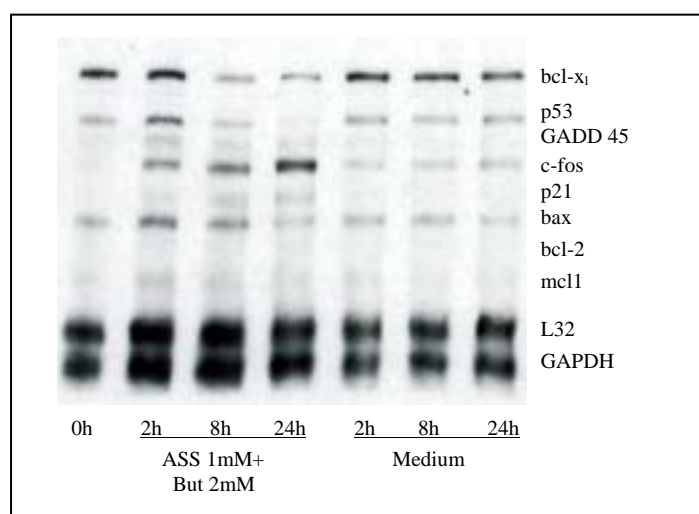


Abb. 10: RNase Protection Assay nach Inkubation von HT-29 Zellen mit ASS und Butyrat.

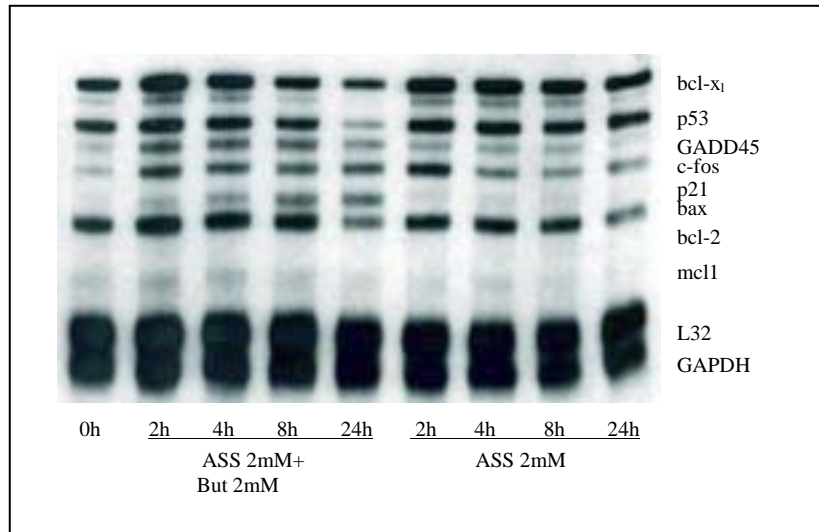


Abb. 11: RNase Protection Assay nach Inkubation von HT-29 Zellen mit ASS und Butyrat.

3.4 Modulation von Faktoren der Zellzykluskontrolle durch Butyrat und Acetylsalicylsäure

3.4.1 CDK1-3

Weder unter Inkubation mit Butyrat noch mit Acetylsalicylsäure alleine sowie in Kombination kommt es zu einer Veränderung von CDK1-, CDK2- und CDK3-mRNA-Spiegeln in HT-29 Zellen (Abb. 17).

3.4.2 CDK4

Nach Behandlung der Zellen mit Butyrat kommt es nach 8h konzentrationsunabhängig zu einer Verringerung der CDK4-mRNA-Expression. Dieser Rückgang ist nach 24h noch deutlicher (Abb. 13). Die Western Blot-Untersuchungen zeigen einen leichten Rückgang von CDK4-Protein nach 48 und 72h (Abb. 12).

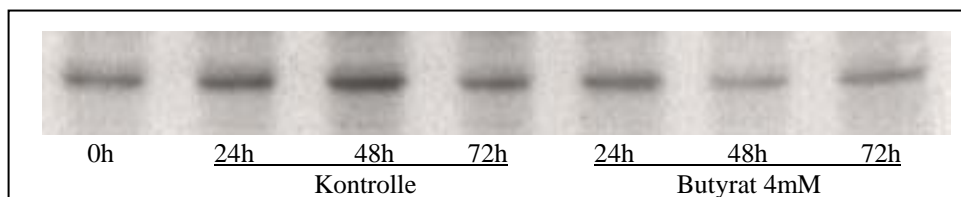


Abb. 12: Western Blot von CDK4 (33kD) nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat.

Acetylsalicylsäure verringert in höherer Konzentration (5mM) die CDK4-mRNA-Expression (Abb. 20). Eine Inkubation der Zellen mit verschiedenen Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombinationen übertrifft die Wirkung von Butyrat nicht (Abb. 14).

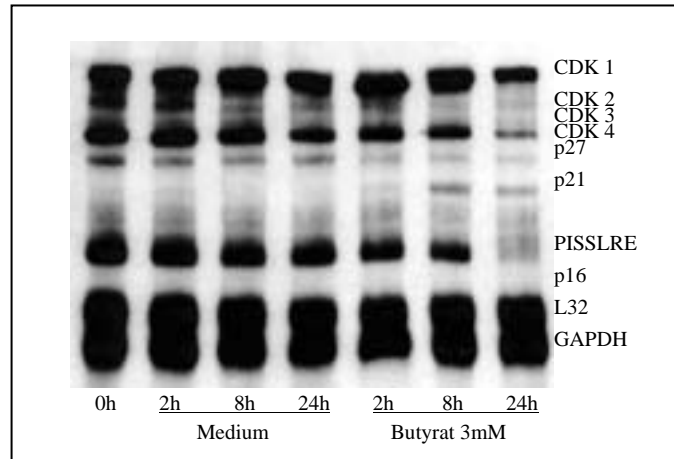


Abb. 13: RNase Protection Assay nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat.

3.4.3 PISSLRE (CDK10)

Nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat (1-5mM) zeigt sich eine deutliche Reduktion der PISSLRE-mRNA-Expression nach 24h, so daß PISSLRE-mRNA nur noch schwach nachweisbar ist. Acetylsalicylsäure verändert die Expression der PISSLRE-mRNA nicht. Behandelt man die Zellen mit einer Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombination, zeigt sich auch hier eine deutliche Verminderung der PISSLRE-mRNA-Expression, die aber die Wirkung von Butyrat nicht übertrifft (Abb. 13, 14).

3.4.4 p16

In HT-29 Zellen kann im RNase Protection Assay keine p16-mRNA nachgewiesen werden. Auch nach Inkubation der Zellen mit Butyrat, Acetylsalicylsäure oder in Kombination läßt sich keine mRNA-Expression von p16 nachweisen (Abb. 14).

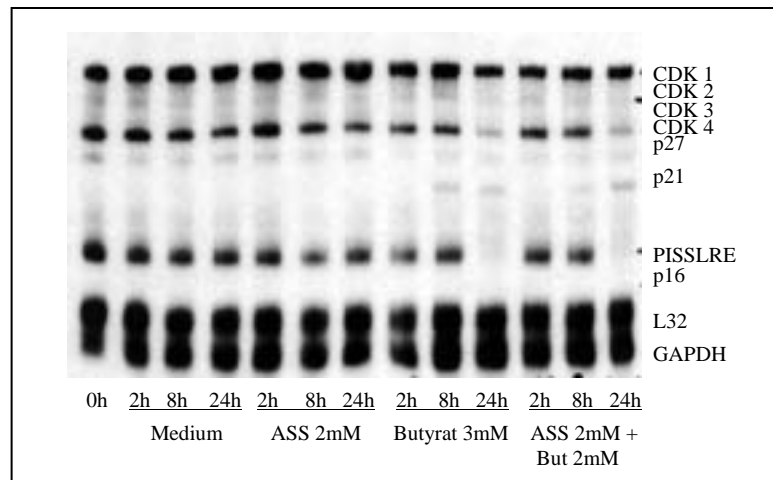


Abb. 14: RNase Protection Assay nach Inkubation von HT-29 Zellen mit ASS, Butyrat sowie der Kombination.

3.4.5 p21

Butyrat induziert nach 2h konzentrationsunabhängig die Expression von p21-mRNA. Das Maximum der p21-mRNA-Expression liegt nach 24h Butyratinkubation (Abb. 19). Auf Proteinebene kommt es zu einer Induktion der p21-Expression durch Butyrat nach 24h. Nach 48 und 72h sind die p21-Level deutlich abgefallen, aber noch nachweisbar (Abb. 15).

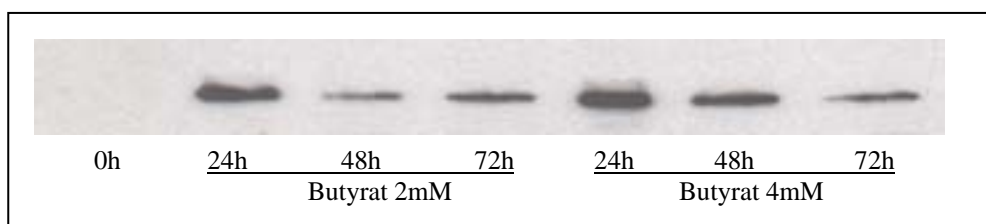


Abb. 15: Western Blot von p21 (21kD) nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat.

Acetylsalicylsäure erhöht in einer Konzentration von 5mM die Expression von p21-mRNA und p21-Protein nach 24h (Abb. 16; 20). Auf Proteinebene kommt es zu einem Abfall der p21-Spiegel nach 48 und 72h (Abb.16).

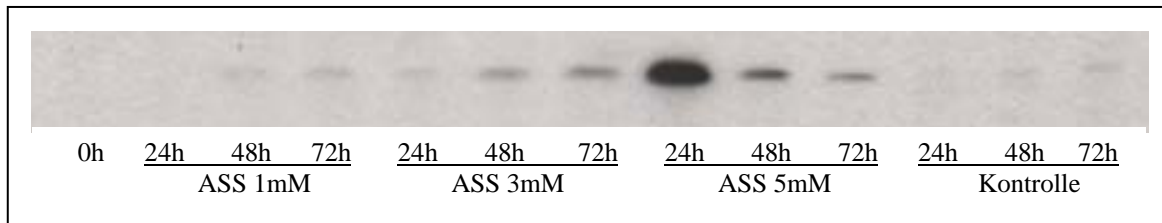


Abb. 16: Western Blot von p21 (21kD) nach Inkubation von HT-29 Zellen mit ASS.

Nach Inkubation von HT-29 Zellen mit einer Kombination aus Acetylsalicylsäure und Butyrat (1-3mM ASS + 1mM Butyrat) zeigt sich sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine deutliche Steigerung der p21-Expression, die die Wirkung der Einzelsubstanzen übertrifft. Auf Proteinebene kommt es zu einer Reduktion der p21-Spiegel nach 24 und 48h (Abb. 17; 18).

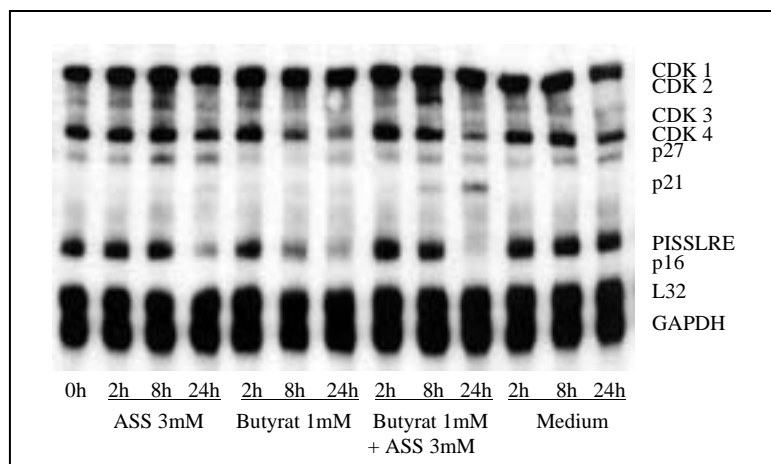


Abb. 17: RNase Protection Assay nach Inkubation von HT-29 Zellen mit ASS, Butyrat sowie der Kombination.

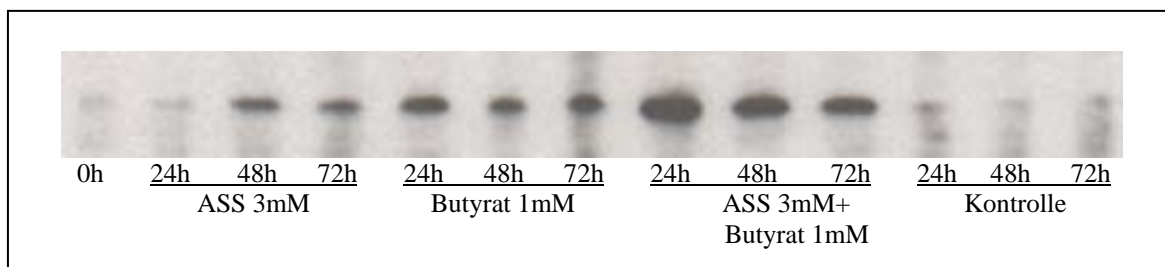


Abb. 18: Western Blot von p21 nach Inkubation von HT-29 Zellen mit ASS, Butyrat sowie der Kombination.

3.4.6 p27

Nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat (1-5mM) kommt es zu einem leichten Rückgang der p27-mRNA (Abb. 13), während die Expression von p27-Protein nicht verändert wird (Abb. 19). Acetylsalicylsäure in einer Konzentration von 5mM induziert die Expression von p27-mRNA nach 24h (Abb. 20). Unter Inkubation mit verschiedenen Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombinationen ändert sich die Expression der p27-mRNA nicht (Abb. 17).

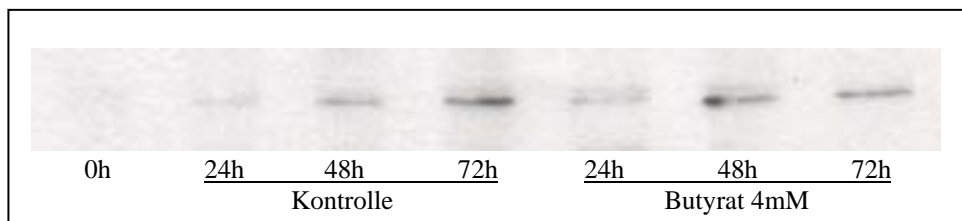


Abb. 19: Western Blot von p27 (27kD) nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat.

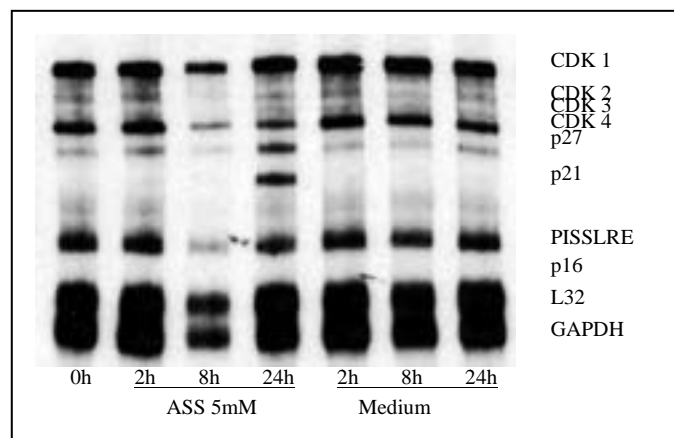


Abb. 20: RNase Protection Assay nach Inkubation von HT-29 Zellen mit ASS.

3.4.7 GADD45

Butyrat verändert die Expression von GADD45-mRNA nicht (Abb. 8). Nach Inkubation der Zellen mit Acetylsalicylsäure in einer Konzentration von 5mM kommt es zu einer Induktion der GADD45-mRNA nach 24h (Abb. 8). Acetylsalicylsäure und Butyrat in Kombination haben keinen Einfluß auf die Expression von GADD45 (Abb. 10).

3.5 Effekte von Butyrat und Acetylsalicylsäure auf die Zellzyklusphasen

3.5.1 Butyrat

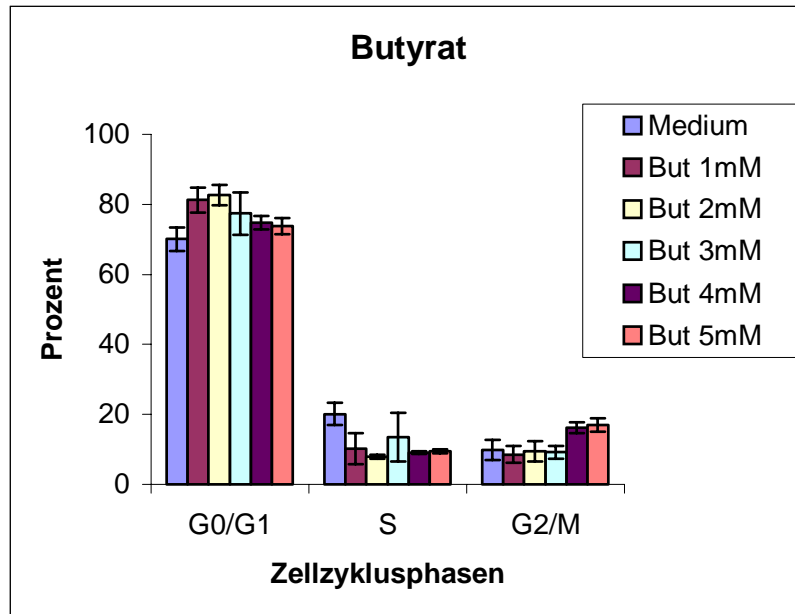


Abb. 21: Prozent der HT-29 Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen nach Inkubation der Zellen mit Butyrat (24h).

Butyrat bewirkt nach 24h in allen getesteten Konzentrationen (1-5mM) einen Anstieg der Zellen in der G₀/G₁-Phase. Dabei liegt der maximale Wert bei Butyrat in einer Konzentration von 2mM (81,2% gegenüber 70,1% unter Kontrollbedingungen, p=0,01). Dieser G₁-Arrest geht auf Kosten der Zellen in der S-Phase (Butyrat 2mM: 7,9% gegenüber 20,1% unter Kontrollbedingungen, p=0,01). Während die Anzahl der Zellen in der G₂/M-Phase bei einer Butyratkonzentration von 1-3mM nahezu gleich bleibt, bewirkt Butyrat in höheren Konzentrationen (4 und 5mM) neben dem G₀/G₁-Arrest auch einen deutlichen Anstieg der Zellen in der G₂/M-Phase (Butyrat 4mM: 16,2% gegenüber 9,8% unter Kontrollbedingungen) (Abb. 21).

3.5.2 Acetylsalicylsäure

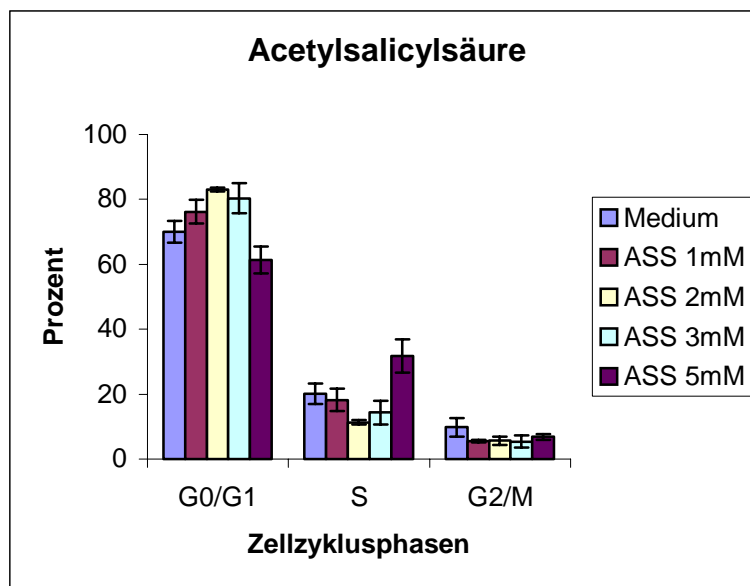


Abb. 22: Prozent der HT-29 Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen nach Inkubation der Zellen mit Acetylsalicylsäure (24h).

Acetylsalicylsäure in einer Konzentration von 1-3mM erhöht in HT-29 Zellen den Anteil der Zellen in der G_0/G_1 -Phase, wobei das Maximum bei einer Konzentration von 2mM liegt (83,1% gegenüber 70,1% unter Kontrollbedingungen). Die Anteile der Zellen in der S-Phase und in der G_2/M -Phase sind dementsprechend verringert. Ein völlig anderes Verteilungsmuster zeigt Acetylsalicylsäure in einer Konzentration von 5mM. Neben einer Reduktion des Anteils der Zellen in der G_0/G_1 -Phase (61,3% gegenüber 70,1%) kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Zellen in der S-Phase (31,8% gegenüber 20,1%) (Abb 22).

3.5.3 Acetylsalicylsäure und Butyrat in Kombination

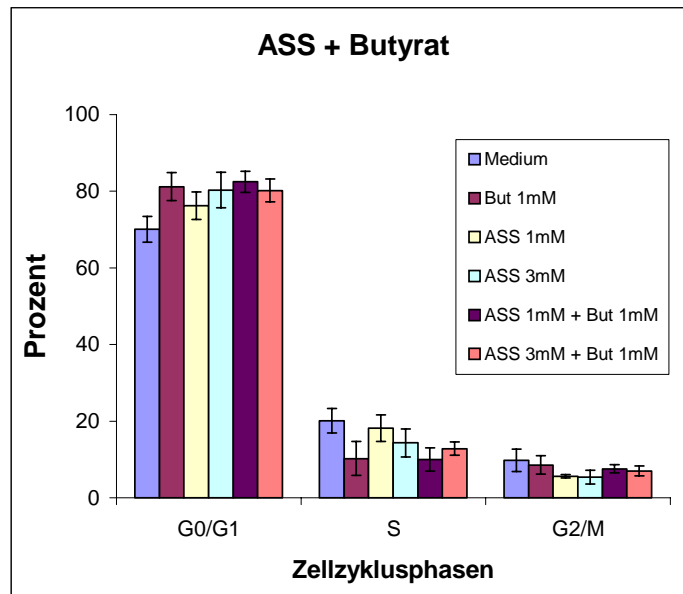


Abb. 23: Prozent der HT-29 Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen nach Inkubation mit ASS, Butyrat alleine und in Kombination (24h).

Nach Inkubation der HT-29 Zellen mit ASS und Butyrat in Kombination kommt es zu keinem größeren Anstieg der Zellen in der G_0/G_1 -Phase verglichen mit der Inkubation mit den Einzelsubstanzen (Butyrat 1mM 81,2%, ASS 1mM/3mM 76,2/80,3%, Kombination aus ASS 1mM und Butyrat 1mM 82,5%, Kombination aus ASS 3mM und Butyrat 1mM 80,2%) (Abb. 23).

4. Diskussion

Die kurzkettige Fettsäure Butyrat wie auch Acetylsalicylsäure hemmen die Proliferation und induzieren Apoptose und Differenzierung von Kolonkarzinomzellen. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß eine Kombination aus beiden Substanzen zumindest additive Effekte hat (Menzel et al. 2002). Der potentielle Wirkmechanismus ist weitgehend unbekannt.

Nach Etablierung der beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurde in dieser Dissertation zunächst die differentielle Genexpression nach Butyratinkubation mittels eines cDNA Expression Arrays untersucht. Ausgewählte Faktoren der Apoptose- und Zellzykluskontrolle wurden anschließend auf ihre Modulation durch eine Inkubation mit ASS, Butyrat sowie in Kombination untersucht.

Butyrat moduliert eine Reihe von Faktoren, darunter zellzyklusregulierende Faktoren wie p21, CDK4 oder P18INK4 sowie apoptoseregulierende Faktoren wie bcl-x_l oder p53. ASS induziert erst in höherer Dosierung p21, p27 und GADD45. Eine Kombination aus ASS und Butyrat induziert den Zellzyklus-Inhibitor p21 im Vergleich zu den Einzelsubstanzen deutlich.

4.1 Differentielle Genexpression durch Butyrat

Der cDNA Expression Array ist eine geeignete Methode, um die Vielzahl von differentiellen mRNA-Expressionen durch Stoffe wie z.B. Butyrat in einem einzigen Ansatz zu untersuchen. In dieser Arbeit zeigten sich 41 (von 1176) Faktoren, die in mindestens zwei von drei unabhängigen Experimenten durch 4mM Butyrat nach 24-stündiger Inkubation moduliert wurden (Tab. 7, 8).

Iacomino et al. beschrieben 60 (von 588) verschiedene Faktoren, die durch Butyrat (4mM) nach einem längeren Inkubationszeitraum von 72h ebenfalls in HT-29 Zellen in ihrer Expression moduliert wurden (Iacomino et al. 2001). Zwei weitere Gruppen konnten mit Hilfe der Array-Technik eine große Übereinstimmung von Faktoren zeigen, die sowohl durch Butyrat als auch durch Trichostatin A (TSA; Histondeacetylaseinhibitor) moduliert wurden. Dabei veränderte Butyrat in SW620 Kolonkarzinomzellen 7% aller untersuchten Sequenzen (689 von 8063), 584 Faktoren zeigten eine Übereinstimmung nach Inkubation der Zellen mit TSA (Mariadason et al.

2000). Della Ragione et al. konnten eine Modulation von 23 Faktoren durch Butyrat (2mM) und TSA nach einer Inkubationszeit von nur 5h aufzeigen (Della Ragione et al. 2001).

Der cDNA Expression Array kann allerdings nur als Screening-Methode gesehen werden, potentielle Modulationen müssen durch andere molekularbiologische Methoden (Northern Blot, RNase Protection Assay, RT-PCR, Western Blot, ELISA) bestätigt werden.

In den Array-Versuchen konnte durch Butyrat eine veränderte Genexpression von Faktoren nachgewiesen werden, deren genaue Funktion noch nicht bekannt ist oder deren Funktionen noch nicht mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden können (Alpha-1-antitrypsin, monocyte/neutrophil elastase inhibitor, Neurogranin, Parathymosin, Proteinkinase C Substrat 80K-H). Daneben wurde aber auch die Expression einer Vielzahl von Faktoren durch Butyrat moduliert, die in Apoptose- und Zellzykluskontrolle sowie DNA-Reparatur-Prozesse involviert sind oder Funktionen bei der Transkriptions- oder Signaltransduktionskontrolle haben. Die folgenden kurzen Ausführungen beschränken sich auf für die (Kolon-) Karzinogenese potentiell relevante Faktoren.

Die Repression des Transkriptionsfaktors **c-myc** durch Butyrat wurde bereits von mehreren Gruppen publiziert (Barnard und Warwick 1993, Basson et al. 1998, Toscani et al. 1988). C-myc ist ein Protoonkogen, das wichtig für Proliferation, Apoptose und Differenzierung ist. Die c-myc-Expression korreliert negativ mit dem Differenzierungsgrad der Zellen (Dang 1991).

Butyrat vermindert darüberhinaus die Expression von **c-myc transcription factor PUF** und dem Transkriptionsfaktor **YB-1**, die die Expression von Genen regulieren, die mit der Zellproliferation assoziiert sind (Caligo et al. 1995, Shibao et al. 1999).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, dessen Expression durch Butyrat verringert wird, ist **ATF4 (activating transcription factor 4)** (Liang und Hai 1997). Desweiteren induziert Butyrat die Expression des Transkriptionsfaktors **BTEB2 (basic transcription element-binding protein 2)** (Kojima et al. 1997). Über die einzelnen Funktionen oder Zielgene von ATF4 und BTEB2 ist bislang noch nichts bekannt.

Der durch Butyrat herunterregulierte **EGF-response factor 1** (butyrate response factor 1) gehört zu der TIS11-Familie. Reuter et al. konnten zeigen, daß ERF-1 ein Bindungspartner für 14-3-3-Proteine ist, die in die Kontrolle des Zellzyklus involviert sind (Reuther und Pendergast 1996). MacLean et al. konnten zeigen, daß Butyrat die mRNA-Level von ERF-1 in HT-29 Zellen schon nach 15min senkt (Maclean et al. 1998).

Cyclin K reguliert wie andere Cycline die Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen, die für die Progression der Zelle durch den Zellzyklus essentiell sind (Edwards et al. 1998). Da potentiell weitere Funktionen von Cyclin K noch nicht bekannt sind, muß die scheinbar paradoxe Induktion der Cyclin K-mRNA-Expression durch Butyrat im cDNA Expression Array weiter geklärt werden.

CDC28 protein kinase 2 hingegen inhibiert die Aktivierung der CDK2 Kinase, die mit dem Voranschreiten des Zellzyklus assoziiert ist. Butyrat könnte also zumindest zum Teil über die Induktion der CDC28 protein kinase 2-Expression eine Proliferationshemmung bewirken (Demetrick et al. 1996).

Butyrat induziert in den Array-Untersuchungen die Expression der **Hitzeschockproteine (heat shock proteins; HSP) 27 und 86**. Diese Proteine scheinen proliferationssteigernd und anti-apoptotisch zu wirken (Garrido et al. 2001). Tan et al. konnten zeigen, daß Butyrat HSP 27 in HT-29 Zellen auf Proteinebene induziert, und postulierten, daß die gleichzeitige Induktion von pro- und anti-apoptotischen Faktoren die niedrigere Apoptoserate in HT-29 Zellen gegenüber HCT-116 Zellen nach Behandlung mit Butyrat bewirkt (Tan et al. 2002).

Auch die Bedeutung der paradoxen Induktion des Apoptoseinhibitors **DAD-1 (defender against cell death 1)** in HT-29 Zellen durch Butyrat sowie potentiell weitere Funktionen der Hitzeschockproteine und DAD-1 in Kolonkarzinomzellen bleiben zu klären (Sugimoto et al. 1995).

Wachstumsfaktoren sowie ihre Rezeptoren weisen in Malignomen eine veränderte Expressionen auf und sind auch als therapeutische Zielproteine aktuell intensiv beforscht (z.B. EGF-Rezeptor, c-kit; Tyrosinkinaseinhibitoren ZD1839 (Iressa),

Imatinib). Im cDNA Expression Array konnten einige Faktoren beschrieben werden, die als Wachstumsfaktoren fungieren oder in Signaltransduktionswege eingreifen.

HDGF (hepatoma-derived growth factor) stimuliert das Wachstum von Fibroblasten und Hepatozyten. Kishima et al. konnten zeigen, daß Antisense-HDGF-Oligonukleotide das Wachstum von Hepatozyten hemmen (Kishima et al. 2002). Ob HDGF und die Suppression der HDGF-mRNA-Expression durch Butyrat auch in Kolonzellen eine Bedeutung hat, bleibt zu klären.

Die Angiogenese ist ein essentieller Faktor für die Entstehung, Progression und Metastasierung maligner Tumore. Ein wichtiger Mediator der Angiogenese ist **VEGF (vascular endothelial growth factor)**. Die VEGF-Expression korreliert mit der Dukes-Klassifikation und der Metastasierung von kolorektalen Karzinomen (Wong et al. 1999). Während das Tumorsuppressorgen p53 die Angiogenese und VEGF inhibiert (Bouvet et al. 1998, Dameron et al. 1994), wurde ein Zusammenhang zwischen dem mutierten p53 in kolorektalen Karzinomen und der erhöhten Expression von VEGF beschrieben (Takahashi et al. 1998). RNase Protection Assays unserer Arbeitsgruppe konnten bestätigen, daß Butyrat die VEGF-mRNA nach 24h in Kolonkarzinomzelllinien (HT-29, SW620, CX-1) herunterreguliert (Etzrodt et al. 2002).

Butyrat verringert die Expression des **Neuromedin-B Rezeptors**, der proliferationsfördernde Effekte auf kleinzellige Lungenkarzinome und Gastrinome hat (Chu et al. 1996). Inwieweit dieser Rezeptor eine Bedeutung in der Kolonkarzinogenese hat, bleibt zu klären.

EPHA1 (tyrosine-protein kinase receptor EPH) gehört zur Familie der EPH Rezeptoren und wird in verschiedenen Karzinomen überexprimiert (Hirai et al. 1987). Ob die in den cDNA Expression Array-Versuchen gezeigte Verringerung der Expression dieses Rezeptors durch Butyrat eine Bedeutung für die Butyrateffekte in Kolonkarzinomzellen hat, bleibt zu klären.

Die **Tyrosinkinase TNK1** und **MAPKAP2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2)** sind in Signaltransduktionswege involviert (Hoehn et al. 1996, Rouse et al. 1994). Über die genaue Funktion in Kolonzellen sowie die Bedeutung einer Butyrat-vermittelten Induktion der TNK1- und MAPKAP2-Expression ist bislang noch nichts bekannt.

BMP4 (bone morphogenetic protein 4), ein Mitglied der TGF β -Familie, ist in Kolonkarzinomzellen mit APC-Mutationen überexprimiert. Desweiteren wird diese Überexpression durch β -Catenin vermittelt (Kim, JS et al. 2002). Eine Bestätigung der cDNA Expression Array-Experimente, in denen Butyrat die mRNA-Expression von BMP4 verringert, könnte den Fokus auf weitere Funktionen dieses Proteins richten sowie ein neuer potentieller Ansatz für eine tumorsuppressive Therapie sein.

M-CSF (macrophage colony stimulating factor-1) verstärkt die Invasivität von Mamma-, Ovar- und Endometriumkarzinomen (Kacinski 1995). Antisense-M-CSF Behandlung von Kolonkarzinom-Xenografts in Mäusen vermindert das Tumorwachstum (Aharinejad et al. 2002). Die Suppression der M-CSF-Expression durch Butyrat könnte eine wichtige Rolle in der karzinoprotektiven Wirkung von Butyrat darstellen.

Ribosomale Proteine spielen eine essentielle Rolle bei der Proteinsynthese. Eine Akkumulation und damit eine gesteigerte Proteinsynthese könnten Modulatoren von Proliferation und Transformation sein. Eine Überexpression von **ribosomal protein S3A** ist in Metastasen von Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen worden, eine **ribosomal protein S19**-Überexpression ist mit höher malignen Kolonkarzinomen assoziiert (Musholt et al. 1997, Kondoh et al. 1992). Die mRNA-Expression von ribosomal protein S3A und S19 wurde in unseren Versuchen durch Butyrat supprimiert.

Mutationen in DNA Mismatch Reparatur Proteinen führen zu der autosomal-dominant vererbten HNPCC. Auch in sporadischen Kolonkarzinomen sind Mutationen dieser DNA Mismatch Reparatur Proteine (**MLH1**, MSH2) nachgewiesen worden, die zu Mikrosatelliteninstabilität (MSI) führen. Hermann et al. konnten zeigen, daß die Promotorregion von MLH1 in 80% der MSI-positiven sporadischen Kolonkarzinome hypermethyliert ist (Herman et al. 1998). Die cDNA Expression Array-Versuche zeigen, daß Butyrat die MLH1-mRNA in HT-29 Zellen induziert. Obwohl HT-29 Kolonkarzinomzellen mikrosatellitenstabil sind (Carethers und Pham 2000), bleibt zu klären, ob in HT-29 Zellen eine Hypermethylierung der CpG-Inseln im Promotor vorliegt und ob Butyrat die Expressionsinduktion von MLH1 möglicherweise durch eine Demethylierung der Promotorregion verursacht.

Das Ubiquitin-Proteasom-System gilt als der hauptsächliche proteolytische Mechanismus zum selektiven Abbau von Proteinen. Neben dem Abbau z.B. falsch gefalteter Proteine hat es zahlreiche Substrate, die in Zellzyklusprogression, Genexpression, Signaltransduktion oder Apoptosekontrolle involviert sind (Naujokat und Hoffmann 2002). Über die genaue Funktion von **proteasome component 3**, deren mRNA eine vermehrte Expression nach Inkubation der Zellen mit Butyrat aufweist, ist allerdings noch nichts bekannt.

High-Mobility-Group (HMG)-Proteine sind Nicht-Histon-Proteine, die als architektonische Elemente die Chromatinstruktur verändern und so die Transkription verschiedener Gene ermöglichen (z.B. NF- κ B oder c-jun-Transkriptionskomplex; Thanos und Maniatis 1996). Erhöhte **HMG-I (Y)**-Spiegel wurden in verschiedenen Tumoren nachgewiesen, darunter auch in kolorektalen Karzinomen (Fedele et al. 1996, Kim, DH et al. 1999). Chiappetta et al. konnten zeigen, daß HMG I (Y) im Gegensatz zu normaler oder hyperplastischer Kolonschleimhaut in Adenomen sowie Karzinomen je nach Dignität bis zu 100% exprimiert wird (Chiappetta et al. 2001). Der HMG I (Y)-mRNA- und Protein-Spiegel in kolorektalen Karzinomen ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Abe et al. 1999). Northern und Western Blot-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, daß die Expression von HMG I(Y)-mRNA und Protein in Kolonkarzinomzellen (HT-29, SW480, SW620) nach Inkubation mit Butyrat deutlich verringert wird (Weihrauch et al. 2002).

Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Modifikationen dieser Interaktionen können zu Tumorzellmigration, Invasivität und Metastasierung führen. Die Integrin α -6 β -4-Expression ist mit Progression und metastatischem Potential verschiedener Karzinome assoziiert (Rabinowitz und Mercurio 1996). Daemi et al. konnten zeigen, daß die Aktivierung der **Integrin β -4**-Untereinheit die Migration und Invasivität in LoVo Kolonkarzinomzellen verstärkt (Daemi et al. 2000). Neben der Herunterregulation der Integrin beta-4-mRNA durch Butyrat im cDNA Expression Array konnte in Western Blot-Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß Butyrat auch Integrin β -4-Protein nach 48h Inkubation reprimiert (HT-29, SW480 und SW620 Zellen; unveröffentlichte Daten).

Ein weiteres Adhäsionsmolekül, das durch Butyrat in seiner Expression induziert wird, ist **Integrin α -L (CD11a)**. Kitayama et al. konnten nachweisen, daß CD11a in kolorektalen Lymphknotenmetastasen herunterreguliert ist (Kitayama et al. 1999). Die Bedeutung einer gesteigerten Expression von CD11a in Tumorgewebe und einer potentiellen Interaktion mit z.B. Lymphozyten bleibt zu klären.

Interleukin-10 hemmt die Synthese von zahlreichen Zytokinen. Il-10-knockout Mäuse entwickeln eine Kolitis und Kolonkarzinome (Sturlan et al. 2001). Die Il-10 Expressionsinduktion durch Butyrat könnte zumindest zum Teil die karzinoprotektiven Effekte durch Butyrat vermitteln.

Die genaue Rolle von **Interleukin 1- β** in der Karzinogenese ist noch nicht genau geklärt. Über die Induktion anderer Zytokine wie auch über die Induktion von NF- κ B wirkt es inflammatorisch. Neben diesen inflammatorischen Wirkungen induziert Interleukin 1- β im Kolon aber auch die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie HGF (Kolon-Fibroblasten; Ota et al. 1999) oder VEGF (Kolonkarzinomzellen; Akagi et al. 1999) und fördert so das Wachstum von Tumorzellen. Western Blot-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten die Reduktion der Interleukin 1- β -mRNA im cDNA Expression Array auch auf Proteinebene bestätigen (unveröffentlichte Daten).

Über eine Senkung freier Radikale oder Toxine könnten antioxidative und biotransformierende Proteine eine protektive Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren spielen. So induziert Butyrat im cDNA Expression Array die Expression von **Glutathion S-Transferase Pi und M4** sowie **Thioredoxinperoxidase 2** und **NKEFB (natural killer cell enhancing factor B)**.

Das Selenoprotein **Glutathionperoxidase-gastrointestinal** ist ebenfalls ein antioxidatives Protein, das das Genom vor oxidativen Schäden schützt und damit die Progression von Tumoren verhindern kann (Esworthy et al. 1998). Allerdings konnten Mörk et al. zeigen, daß die Glutathionperoxidase-gastrointestinal in Adenomen im Vergleich zu normaler Kolonmukosa eine deutlich erhöhte Expression aufweist (Mörk et al. 2000). In den cDNA Expression Array-Untersuchungen in dieser Arbeit konnte eine deutliche mRNA-Expressionsreduktion von Glutathionperoxidase-gastrointestinal

nachgewiesen werden. Um der potentiellen Rolle der Glutathionperoxidase-gastrointestinal in der Kolonkarzinogenese zu begegnen, bedarf es weiterer Untersuchungen.

In den Untersuchungen zur differentiellen Genexpression durch die Array-Technik konnte in dieser Arbeit sowie von anderen Gruppen (Della Ragione et al. 2001, Iacomino et al. 2001, Mariadason et al. 2000) eine große Gruppe von interessanten Faktoren beschrieben werden, die durch Butyrat in ihrer Expression moduliert werden. Dabei spielen neben Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktionsproteinen auch apoptose- und zellzyklusregulierende Faktoren eine bedeutende Rolle, die in dieser Arbeit genauer untersucht wurden.

4.2 Butyrat moduliert in HT-29 Kolonkarzinomzellen die Expression von apoptose- und zellzyklusregulierenden Faktoren

In dieser Arbeit konnte für eine Reihe von apoptose- und zellzyklusregulierenden Faktoren aufgezeigt werden, daß sie durch Butyrat in ihrer Expression verändert werden.

4.2.1 Apoptoseregulierende Faktoren

Die Expression der **bcl-x₁**-mRNA in HT-29 Zellen wurde durch Butyrat reduziert. Bcl-x₁ gehört zu der apoptoseregulierenden bcl-2-Familie und wirkt anti-apoptotisch. Die Ergebnisse dieser Arbeit korrelieren mit den Untersuchungen von Litvak et al., die an Caco-2 Kolonkarzinomzellen zeigen konnten, daß Butyrat die Expression von bcl-x₁ vermindert (Litvak et al. 1998). Moss et al. konnten dagegen in HT-29 Zellen nicht zeigen, daß Butyrat die Expression von bcl-x₁ inhibiert (Moss et al. 1996). Die Expression weiterer Mitglieder der bcl-2-Familie (**bcl-2**, **bax**, **mcl1**) wurde durch Butyrat in der von uns untersuchten Zelllinie HT-29 nicht moduliert. Während die Nicht-Modulation von bax und mcl-1 mit den Daten von Moss et al. korreliert, konnte diese Gruppe einen leichten Anstieg von bcl-2 in HT-29 Zellen durch Butyrat beobachten (Moss et al. 1996). Im Gegensatz dazu, konnten Litvak et al. zeigen, daß Butyrat die mRNA-Expression von bcl-2 in Caco-2 Zellen reduziert (Litvak et al. 1998). Hague et al. beobachteten eine Reduktion von bcl-2 durch Butyrat in RG/C2 und BH/C1 Kolonadenomzellen (Hague et al. 1997). Eine Induktion des in dieser Arbeit nicht

untersuchten pro-apoptotischen bak durch Butyrat konnten Hague et al. (Adenomzelllinie), Moss et al. (HT-29) und Ruemmele et al. (Caco-2) beobachten (Hague et al. 1997, Moss et al. 1996, Ruemmele et al. 1999).

Obwohl die Datenlage nicht ganz einheitlich ist, ist festzuhalten, daß die Butyrat-vermittelte Apoptoseinduktion zumindest zum Teil über eine Modulation pro- und anti-apoptotischer Mitglieder der bcl-2-Familie vermittelt wird. Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Subpassagen der Zelllinien (genetische Mutationen) oder unterschiedlich differenzierten Zelllinien (Hague et al. 1997).

Das Tumorsuppressorgen **p53** liegt in HT-29 Zellen mutiert vor. Während Wildtyp-p53 Zellzyklusarrest und Apoptose induziert, besitzt das mutierte p53 ein malignes Potential. Mutiertes p53 induziert zum Beispiel die Expression des Angiogenesefaktors VEGF (Takahashi et al. 1998). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Butyrat die Expression des mutierten p53 in HT-29 Zellen deutlich verringert, was in Einklang mit den Ergebnissen anderer Gruppen steht (Coradini et al. 2000, Gope und Gope 1993, Palmer et al. 1997).

Butyrat induziert in HT-29 Zellen die **c-fos**-mRNA. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen von Souleimani et al. sowie Toscani et al. (Souleimani und Asselin 1993, Toscani et al. 1998). Der Transkriptionsfaktor c-fos dimerisiert mit c-jun und bildet den Transkriptionskomplex AP-1, der die Expression von Faktoren induziert, die in Zellproliferation und -differenzierung involviert sind (Bohmann et al. 1987).

4.2.2 Zellzyklusregulierende Faktoren

Von den untersuchten Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK1-4) wurde die Expression von **CDK4**-mRNA durch Inkubation mit Butyrat deutlich verringert, während es auf Proteinebene nur zu einem geringen Rückgang der CDK4-Expression kam. CDK4 übt ihre Funktion mit den regulatorischen Partnern, den D-Cyclinen, in der frühen Phase der G₁-Phase aus und ist wichtig für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F und den Übergang in die S-Phase. Kontroverse Daten lieferte die Arbeit von Siavoshian et al., in der an HT-29 Zellen gezeigt werden konnte, daß Butyrat die Expression von CDK4-

Protein nicht moduliert. Dagegen wurde die Expression von CDK2 in der gleichen Zelllinie durch Butyrat deutlich vermindert (Siavoshian et al. 1997). Eine Modulation der mRNA von **CDK2**, die mit den Cyclinen A und E assoziiert ist und den Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase bewirkt, konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Allerdings konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß Butyrat in höheren Konzentrationen als den hier untersuchten (>5mM) die Expression von CDK2-Protein vermindert.

Auch **CDK1** und **CDK3** wurden durch Inkubation der Zellen mit Butyrat in ihrer Expression nicht verändert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Butyrat die **PISSLRE (CDK10)**-mRNA in HT-29 Zellen reduziert. PISSLRE ist ein zellzyklus-regulierender Faktor, der zu der Gruppe der Cyclin-abhängigen Kinasen gehört. PISSLRE ist für den Übergang der Zellen von der G₂/M-Phase in die S-Phase notwendig (Li, S. et al. 1995). Über weitere Funktionen sowie über die Regulation des PISSLRE-Gens ist bislang wenig bekannt. Eine aktuelle Arbeit konnte eine Interaktion von CDK10 mit dem Transkriptionsfaktor Ets2 nachweisen (Kasten und Giordano 2001). Aktuelle Daten in cDNA Expression Array-Versuchen mit Butyrat konnten die Supprimierung der PISSLRE-mRNA Expression in HT-29 Zellen bestätigen (Della Ragione et al. 2001, Iacomino et al. 2001).

p16 ist in etwa 40% aller Kolonkarzinome durch Hypermethylierung der Promotorregion inaktiviert (Dai et al. 2000). In den von uns untersuchten HT-29 Zellen konnte keine p16-mRNA nachgewiesen werden, was durch die Untersuchungen von Siavoshian et al. bestätigt wurde (Siavoshian et al. 1997). Auch nach Inkubation der Zellen mit Acetylsalicylsäure oder Butyrat kam es zu keiner Re-Expression von p16-mRNA. Burri et al. konnten zeigen, daß die Promotorregion von p16 in HT-29 Zellen homozygot methyliert ist (Burri et al. 2001).

Die Expression von **p27** wurde nach Inkubation von HT-29 Zellen mit Butyrat auf Proteinebene nicht moduliert, während es auf mRNA-Ebene zu einem leichten Rückgang kam. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch mit den Untersuchungen von Litvak et al., die zeigen konnten, daß Butyrat die p27-Expression in Caco-2 Kolonkarzinomzellen induziert (Litvak et al. 1998). Eine erniedrigte Expression von

p27 in Kolonkarzinomen ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Sgambato et al. 2000). Yamamoto et al. konnten in *in vitro*-Untersuchungen zeigen, daß eine Überexpression von p27 HT-29 Zellen zu einer gesteigerten Differenzierung und Proliferationshemmung gegenüber äußeren Stimuli sensibilisiert (Yamamoto et al. 1999). Die Effekte von Butyrat auf Kolonkarzinomzellen scheinen aber nach unseren Ergebnissen nicht über eine Modulation des Zellzyklusinhibitors p27 vermittelt zu werden.

Butyrat induzierte in HT-29 Zellen die Expression von **p21**. Dabei erfolgte der Anstieg der p21-mRNA schon nach 2h, während es zu einer deutlichen Induktion der p21-Protein-Expression nach 24h kam. Diese Ergebnisse korrelieren mit Untersuchungen anderer Gruppen (Litvak et al. 1998, Siavoshian et al. 1997, Coradini et al. 2000). p21 ist ein universaler Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen, das jedoch vor allem CDKs hemmt, die in der G₁-Phase oder am G₁/S-Übergang wirksam sind (Sherr und Roberts 1999, Xiong et al. 1993). Induziert wird p21 über p53-abhängige und p53-unabhängige Mechanismen.

Während p21 in normaler Schleimhaut des Kolons vor allem in den apikalen Abschnitten der Kolonkrypte lokalisiert ist, wird p21 in kolorektalen Karzinomen vermindert exprimiert (Slebos et al. 1996, Polyak et al. 1996). Die Suppression von p21 in kolorektalen Karzinomen ist mit einem niedrigen Differenzierungsgrad der Zellen (Doglioni et al. 1996) sowie mit p53-Mutationen korreliert (Viale et al. 1999, Matsushita et al. 1996). Patienten mit kolorektalen Tumoren, in denen mehr als 50% der Zellen p21 exprimieren, haben im Vergleich zu Patienten mit Tumoren, in denen weniger als 50% der Zellen p21 exprimieren, eine verbesserte Überlebenschance (Holland et al. 2001). Die Hemmung der Proliferation in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien durch Butyrat ist mit einer gesteigerten Induktion der p21-Expression assoziiert (Nakano et al. 1997). Archer et al. konnten zeigen, daß p21 für die proliferationshemmenden Effekte von Butyrat in HT-29 Kolonkarzinomzellen notwendig ist (Archer et al. 1998). Die Induktion der p21-Expression korreliert mit dem Differenzierungsgrad der Zellen. In sich differenzierenden Zellen liegt ein gesteigerter p21-Spiegel vor (Evers et al. 1996, Gartel et al. 1996, Steinman et al. 1994). Die Rolle von p21 in der Apoptoseinduktion wird kontrovers diskutiert. Zum einen wird

postuliert, daß eine gesteigerte p21-Expression Apoptose verhindert. Andere Studien zeigen, daß eine p21-Induktion sowohl mit einer p53-abhängigen als auch mit einer p53-unabhängigen Apoptoseinduktion assoziiert ist (El-Deiry et al. 1994, Blagosklonny et al. 1995). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß p21-Protein nach initialer Induktion (24h) durch Butyrat nach 48 und 72h wieder deutlich abfällt. Chai et al. konnten zeigen, daß Butyrat die p21-Expression initial induziert, daß aber für den weiteren Apoptoseverlauf der p21-Spiegel notwendigerweise wieder abfallen muß. Ohne die Degradierung von p21 durch Caspase-3 wurde die Butyrat-vermittelte Apoptose gehemmt (Chai et al. 2000). Auch Yamamoto et al. zeigten, daß es in HT-29 Zellen unter Butyrat nach initialer p21-Induktion zu einem Abfall der p21-Spiegel nach 48h kam. HT-29 Zellen, in denen p21-Protein überexprimiert wurde, zeigten eine geringere Butyrat-vermittelte Differenzierung (Yamamoto et al. 1999). Obwohl p21 kein Transkriptionsfaktor ist, scheinen einige Wirkungen von p21 auf die Regulation der zellulären Genexpression zurückzuführen sein. Chang et al. konnten in cDNA Expression Array-Versuchen zeigen, daß p21 eine Vielzahl von Faktoren moduliert, die in DNA-Replikation, Reparaturmechanismen und Zellzyklus-Progression involviert sind (Chang et al. 2000). Archer et al. postulierten, daß p21 die Expression von Cyclin B in HT-29 Zellen vermindert (Archer et al. 2000). Zusammenfassend ist also festzuhalten, daß p21 ein wichtiger Faktor in der Kontrolle von Proliferation, Apoptose und Differenzierung ist. Nach Induktion von Differenzierung und Apoptose scheint aber eine Degradierung von p21 für den weiteren Verlauf notwendig zu sein. Inwieweit sich diese Beobachtung nur auf die Zelllinie HT-29 bezieht, und ob die p21-Induktion in p53-mutierten Zellen eine andere Rolle spielt als in Zellen, die ein intaktes p53 Tumorsuppressorgen besitzen, bleibt zu klären. Aufgrund der Tatsache, daß p21-Mutationen sehr selten in menschlichen Tumoren zu finden sind (Shiohara et al. 1994), könnte die Modulation von p21 ein sinnvoller Ansatz bei der Prävention und Therapie des kolorektalen Karzinoms sein.

Um der Frage nachzugehen, wie sich die Butyrateffekte direkt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus auswirken, führten wir eine Zellzyklusanalyse durch. In unseren Experimenten bewirkte Butyrat einen G₀/G₁-Arrest in HT-29 Zellen. Dabei kam es konzentrationsabhängig (Butyrat 4 und 5mM) gleichzeitig zu einem Anstieg des Anteils

der Zellen in der G₂/M-Phase, der in niedrigeren Konzentrationen nicht auftrat. Mehrere Gruppen beschrieben einen alleinigen G₀/G₁-Arrest von Kolonkarzinomzellen durch Butyrat (Barnard und Warwick 1993, Schwartz et al. 1998, Siavoshian et al. 2000). Heerdt et al. konnten ebenfalls einen synchronen G₀/G₁- und G₂/M-Phasen-Arrest nach 24-stündiger Butyratinkubation (5mM) in SW620 Kolonkarzinomzellen feststellen (Heerdt et al. 1997). Einen alleinigen G₂/M-Phasen-Arrest in Caco-2 Zellen konnten Harrison et al. nach Inkubation der Zellen mit Butyrat (3mM) beobachten (Harrison et al. 1999). Die von uns bei der Zellzyklusanalyse beobachtete Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht durch eine konzentrationsabhängige Modulation der in dieser Arbeit untersuchten Faktoren erklärt werden.

Butyrat und Histon-Hyperacetylierung

Die genauen Mechanismen der vielfältigen Butyratwirkungen sind noch nicht geklärt. Es ist aber bekannt, daß Butyrat die Chromatinstruktur durch Hyperacetylierung von nukleären Histonproteinen moduliert. Butyrat hemmt dabei nichtkompetitiv und reversibel das Enzym Histondeacetylase (HDAC) (Sealy und Chalkley 1978). Histonproteine sind strukturelle Proteine, die die DNA in Nukleosomen organisieren. Sowohl die Replikation als auch die Transkription erfordern ein Entwinden der DNA. Histonhyperacetylierung geht mit einer Entpackung der Chromatinstruktur einher, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA zuläßt (Grunstein 1997). Ein weiterer spezifischer HDAC-Inhibitor ist Trichostatin A (TSA), ein Fungizid, das strukturell keine Ähnlichkeit mit Butyrat aufweist (Yoshida et al. 1990). Vergleicht man die Wirkungen von Butyrat und TSA in verschiedenen Zelllinien, so zeigt sich, daß TSA die selben Effekte auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung sowie auf die Modulation bestimmter Faktoren hat wie Butyrat (Della Ragione et al. 2001, Mariadason et al. 2000). Archer et al. konnten nachweisen, daß die Histonhyperacetylierung für die Induktion von p21 durch Butyrat notwendig ist (Archer et al. 1998). Die selbe Gruppe konnte zeigen, daß kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Coproat), die keinen Effekt auf Zelldifferenzierung, Proliferation oder Apoptose von Kolonkarzinomzellen hatten, im Gegensatz zu Butyrat Histonproteine nicht modulierten (Hinnebusch et al. 2002). Unterschiede in der Hyperacetylierung von Histonen durch Butyrat oder Trichostatin A zeigen sich in der Kinetik. Hierbei kommt es nach

Inkubation von Zellen mit Butyrat zu einem länger andauernden Effekt auf die Histonhyperacetylierung als nach Inkubation mit TSA (Della Ragione et al. 2001, Mariadason et al. 2000, Siavoshian et al. 2000, Wu et al. 2001).

Neben den Histonproteinen scheinen aber auch Nicht-Histon-Proteine der High-Mobility-Group (HMG) für die Butyrat-vermittelte Wirkung wichtig zu sein. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß Butyrat HMG-N2 hyperacetyliert und HMG-I(Y) supprimiert (Luhrs et al. 2002).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die kurzkettige Fettsäure Butyrat als ein physiologisches Produkt balaststoffreicher Ernährung eine komplexe Modulation der Genexpression initiiert. Dabei sind diese Effekte mit einer Histonhyperacetylierung und damit verbundener Veränderung der Chromatinstruktur sowie Transkription assoziiert. Möglicherweise stellt die Butyrat-modulierte Hyperacetylierung einen wichtigen gemeinsamen Ausgangspunkt der vielfältigen Butyratwirkungen dar.

4.3 Acetylsalicylsäure und apoptose- und zellzyklusregulierende Faktoren

Eine Inkubation von HT-29 Zellen mit Acetylsalicylsäure zeigte keinen Effekt auf die Expression von Mitgliedern der bcl-2-Familie (bcl-x₁, bax, bcl-2, mcl1) oder von p53. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurden keine Korrelationen zwischen der bekannten Apoptoseinduktion durch Acetylsalicylsäure und apoptose-auslösenden Faktoren beschrieben.

Während Acetylsalicylsäure in einer Konzentration von 1-3mM keine Effekte auf die in dieser Arbeit untersuchten zellzyklusregulierenden Faktoren hatte, induzierte Acetylsalicylsäure in einer Konzentration von 5mM die Expression der zellzyklusinhibierenden Faktoren GADD45, p21, p27 und reduzierte die Expression von CDK4. Die Modulation dieser Faktoren durch ASS konnte bisher von anderen Gruppen nicht bestätigt werden. Shiff et al. postulierten, daß ASS die Expression von CDK1- und 2-Protein nach 72-stündiger Inkubation von HT-29 verringert (Shiff et al. 1996), was in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene bis 24h nicht bestätigt werden konnte. Sulindac, ein nicht-steroidales Antirheumatikum, induziert nach Goldberg et al. die Expression von p21 und reduziert die Expression von p53, CDK1, 2 und 4 sowie von Cyclin A und B1

in HT-29 Zellen (Goldberg et al. 1996). Eine kürzlich erschienene Arbeit konnte mittels der cDNA Expression Array-Technik 176 Faktoren beschreiben, deren Expression in drei Kolonkarzinomzelllinien durch ASS 1mM innerhalb von 24h moduliert wurde (Iizaka et al. 2002). Eine weitere Arbeit veröffentlichte 534 Faktoren, deren Expression durch Sulindac moduliert wird (Mariadason et al. 2000). Über welche Signaltransduktionswege Acetylsalicylsäure die Expression für die Kolonkarzinogenese relevante Faktoren moduliert, ist noch unklar, weitere Untersuchungen müssen folgen.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen bewirkte ASS in niedrigeren Konzentrationen (1-3mM) in HT-29 Kolonkarzinomzellen einen G_0/G_1 -Arrest. Während der Anteil der Zellen in der G_2/M -Phase keine Veränderungen zeigte, war der Anteil der Zellen in der S-Phase erniedrigt. Andere Gruppen konnten ebenfalls an HT-29 Zellen einen G_0/G_1 -Arrest nach ASS-Inkubation beobachten. Die benutzte Acetylsalicylsäure-Konzentration lag bei 1 und 3mM (Qiao et al. 1998, Shiff et al. 1996). In höherer Konzentration (5mM) zeigte sich in unseren Experimenten eine Erhöhung des S-Phasen-Anteils, während die Zahl der Zellen in der G_0/G_1 -Phase reduziert war. Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit den beobachteten Expressionsveränderungen von p21, p27, CDK4 und GADD45 durch ASS in einer Konzentration von 5mM. Untersuchungen von Subbegowda zeigen, daß Acetylsalicylsäure in Konzentrationen $>2,5$ mM den Zellzyklus in der S- und G_2/M -Phase arretiert (HT-29, SW620 Zellen), eine Konzentration in der Acetylsalicylsäure auf die Zellen toxisch wirkte (Subbegowda und Frommel 1998). Ob die Modulationen durch ASS 5mM (p21, GADD45, p27, CDK4), die bei niedrigeren Konzentrationen nicht beobachtet werden konnten, spezifische Effekte der Acetylsalicylsäureinkubation sind, oder aber infolge einer Nekroseinduktion auftreten, ist noch offen. Für den beschriebenen G_0/G_1 -Arrest durch Acetylsalicylsäure in niedrigeren Konzentrationen (1-3mM) konnten in dieser Arbeit keine Expressionsveränderungen von zellzyklusregulierenden Faktoren nachgewiesen werden.

Cox-abhängige und Cox-unabhängige Effekte

Viele NSAIDs, darunter auch Acetylsalicylsäure und sein aktiver Metabolit Sulindacsulfid, hemmen die Proliferation von Kolonkarzinomzellen *in vitro*. Auch die Induktion von Apoptose ist ein potentiell wichtiger Mechanismus, durch den NSAIDs ihren antineoplastischen Effekt bewirken können. Eine Reihe von Arbeiten lassen schlußfolgern, daß die Hemmung der Cyclooxygenase-2 für die karzinoprotektiven Effekte entscheidend zu sein scheint. Cyclooxygenasen katalysieren die Reaktion von der Arachnidonsäure zu den Prostaglandinen. Cox-2-Level sind wie die Prostaglandin E₂-Level in kolorektalen Karzinomen erhöht (Eberhart et al. 1994, Hao et al. 1999, Pugh und Thomas 1994, Rigas et al. 1993, Sano et al. 1995). PGE₂ stimuliert die Proliferation von HT-29 und SW1116 Kolonkarzinomzellen *in vitro* (Qiao et al. 1995). Cox-2-transfizierte Epithelzellen von der Ratte zeigen eine erhöhte Expression von Prostaglandinen, erhöhte bcl-2-Level und eine Resistenz gegenüber Butyrat-induzierter Apoptose (Tsujii und DuBois 1995).

Im Gegensatz dazu zeigen Untersuchungen, daß die Wirkungen von NSAIDs auf das Verhalten von Kolonkarzinomzellen nicht allein durch die Hemmung von Cox-2 erklärt werden können.

In *in vitro*-Experimenten fand sich, daß NSAIDs Wirkungen auf Proliferation, Apoptose und die Zellzyklusverteilung an Zelllinien haben, die kein Cox-2 besitzen (Elder et al. 1997, Hanif et al. 1996). Sulindacsulfon, ein Metabolit von Sulindacsulfid, hat keine Cox-2-inhibitorische Komponente, hemmt aber die Proliferation und induziert Apoptose in HT-29 Zellen (Piazza et al. 1995). Mögliche Cox-unabhängige Wirkmechanismen werden derzeit diskutiert.

So sind NSAIDs Liganden für PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) (Lehmann et al. 1997). PPAR- γ ist ein Hormonrezeptor, der eine Bedeutung für die Differenzierung von Adipozyten hat. Mehrere Gruppen konnten zeigen, daß PPAR- γ -Liganden (Thiazolidindione) die Proliferation von Kolonkarzinomzellen hemmen und den Differenzierungsgrad der Zellen fördern (Brockman et al. 1998, Sarraf et al. 1998). Darüberhinaus hemmen NSAIDs die Translokation von NF- κ B in den Nukleus, so daß der Transkriptionsfaktor NF- κ B nicht die Möglichkeit hat, die Expression anti-apoptotischer Gene zu induzieren (Kopp und Ghosh 1994).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß beide Mechanismen – sowohl der Cox-abhängige als auch der Cox-unabhängige – eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der anti-neoplastischen Effekte der NSAIDs spielen.

4.4 Kombination aus ASS und Butyrat

Experimente unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, daß eine ASS/Butyrat-Kombination im Vergleich zu einer Inkubation von Kolonkarzinomzellen mit Acetylsalicylsäure und Butyrat alleine additive Effekte auf die Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion hat (Menzel et al. 2002).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Kombination aus ASS und Butyrat deutlich verstärkte Effekte auf die Protein- und mRNA-Expression des Zellzyklusinhibitors p21 im Vergleich zu den Einzelsubstanzen hat. Die verstärkten Effekte der Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombinationen auf Proliferation und Apoptose können zumindest zum Teil durch diese synergistische Induktion von p21 erklärt werden. Experimente zur Verteilung der mit ASS und Butyrat inkubierten Zellen im Zellzyklus konnten keinen größeren Anteil der Zellen an der G₀/G₁-Phase zeigen. So konnten also keine unmittelbaren Effekte dieser verstärkten p21-Induktion auf den Zellzyklus gezeigt werden. Es ist jedoch bekannt, daß p21 –ohne ein Transkriptionsfaktor zu sein- indirekt die Genexpression spezieller Gene moduliert. So induziert oder reduziert p21 die Expression von Genen, die mit Mitose, Zellwachstum, DNA Reparaturmechanismen oder Apoptose in Verbindung gebracht werden (Chang et al. 2000). Ob die Kombination aus ASS und Butyrat also weitere verstärkte Expressionsveränderungen bewirkt, bleibt zu klären.

Crew et al. konnten ebenfalls zeigen, daß ein Cox-2-spezifischer Inhibitor (NS-398) die antineoplastischen Effekte von Butyrat in HT-29 Kolonkarzinomzellen verstärkt. So wurde Cox-2 in diesen Zellen durch Butyrat induziert. Crew et al. postulierten, daß durch Hemmung dieses induzierten Cox-2-Proteins die Resistenz gegenüber der Butyrat-induzierten Apoptose aufgehoben ist, und ein Cox-2-Inhibitor die Zellen gegenüber Butyrat sensibilisiert. Koinkubation von Kolonkarzinomzellen, denen Cox-2 fehlt (S/KS), mit NS-398 und Butyrat konnte den proliferationshemmenden Effekt von Butyrat nicht verstärken (Crew et al. 2000). Diese Beobachtung wird durch die Untersuchungen von Tsujii und DuBois unterstützt. Intestinale Epithelzellen der Ratte,

die mit einem Cox-2-exprimierenden Vektor transfiziert wurden, waren resistent gegenüber Butyrat-induzierter Apoptose (Tsujii und DuBois 1995).

Ein weiterer möglicher Mechanismus, wie die Kombination aus Acetylsalicylsäure und Butyrat verstärkt auf Proliferation und Apoptose wirken könnte, ist die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Acetylsalicylsäure hemmt wie andere NSAIDs die Aktivierung von NF- κ B, indem die Degradierung von I κ B inhibiert wird (Kopp und Ghosh 1994). Verschiedene Gruppen konnten inzwischen an Kolonkarzinomzellen zeigen, daß Butyrat die Translokation von NF- κ B in den Kern hemmt (Inan et al. 2000, Luhrs et al. 2001, Segain et al. 2000). Acetylsalicylsäure und Butyrat verhindern so die erhöhte Transkription anti-apoptotischer Faktoren durch NF- κ B. Denkbar wäre ein synergistischer Effekt auf die Apoptoseinduktion durch eine Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombination.

Ein weiterer potentieller Wirkmechanismus der ASS/Butyrat-Kombination ist die Modulation von PPAR- γ . PPAR- γ wird im Kolon exprimiert (DuBois et al. 1998). Die Aktivierung dieses Hormonrezeptors durch synthetische Liganden (Rosiglitazone, Triglitazone, Ciglitazone) hemmt in Kolonkarzinomzellen die Proliferation, induziert Apoptose und erhöht den Differenzierungsgrad der Zellen (Brockman et al. 1998, Sarraf et al. 1998, Yang und Frucht 2001). Unsere Arbeitsgruppe sowie Wachtershäuser et al. konnten zeigen, daß Butyrat die PPAR- γ -Expression in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien induziert (Wachtershauser et al. 2000, Weber et al. 2000). Neben natürlichen Liganden von PPAR- γ (Prostaglandine, Fettsäuren) sind auch NSAIDs wie Acetylsalicylsäure Aktivatoren dieses Rezeptors (Lehmann et al. 1997). Eine Acetylsalicylsäure/Butyrat-Kombination könnte so über die Induktion und Aktivierung von PPAR- γ ihre Einzelwirkungen auf Proliferation und Apoptose verstärken.

5. Ausblick

Die kurzkettige Fettsäure Butyrat moduliert die Expression von Genen, die Proliferation, Apoptose und Differenzierung beeinflussen. Vergleicht man die Effekte des spezifischen HDAC-Inhibitors Trichostatin A mit den dargestellten Butyratwirkungen, so zeigt sich, daß zumindest zum Teil auch die Butyrateffekte auf die Hemmung des Enzyms Histondeacetylase zurückzuführen sind. Eine solche Wirkweise, die die Genexpression in Karzinomzellen oder Karzinomvorläuferzellen derart moduliert, daß z.B. die Funktion eines mutierten p53-Tumorsuppressorgens kompensiert werden kann, könnte ein neuer Ansatz für eine Malignomtherapie darstellen. Sowa et al. bezeichnen diese Methode als genregulierende Chemotherapie oder Chemoprävention (Sowa und Sakai 2000). Neuere Veröffentlichungen zeigen, daß Butyrat *in vitro* nicht nur spezifisch auf Kolonkarzinomzellen wirkt, sondern u.a. auch auf leukämische Zellen, Melanom-, Lungen- oder Magenkarzinomzellen (Bidon et al. 2001, Demary et al. 2001, Lavelle et al. 2001, Litvak et al. 2000).

Um den genauen Wirkmechanismus von Butyrat zu erforschen und einen Beweis für die Notwendigkeit der HDAC-Inhibierung für die Butyrateffekte zu erlangen, bedarf es weiterer Experimente. So könnten die Effekte von Butyrat in HDAC-überexprimierenden (transfizierten) Zellen aufgehoben oder zumindest minimiert sein.

Ein weiterer wichtiger Aspekt zukünftiger Experimente wäre, die Effekte von Butyrat oder Acetylsalicylsäure an Primärkulturen aus kolorektalen Biopsien oder Resektaten zu untersuchen. Zum einen sind diese Primärkulturen nicht über Jahrzehnte wie etablierte Zellkultursysteme möglichen genetischen Veränderungen ausgesetzt, zum anderen könnten dann normale Schleimhaut sowie alle Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz auf die Inkubationseffekte untersucht werden. Die Etablierung entsprechender Kulturen ist Gegenstand aktueller Arbeiten unserer Arbeitsgruppe. Emenaker et al. konnten kürzlich zeigen, daß Butyrat p53, p21, bax, bcl-2 und PCNA auch in kolorektalen Primärkulturen moduliert (Emenaker et al. 2001).

Kombinationstherapien sind in der Medizin weit verbreitete Therapiekonzepte. Gründe hierfür liegen in der überadditiven Wirkung der Kombinationen gegenüber den Einzelsubstanzen sowie in den geringeren Resistenzbildungen und Nebenwirkungen, da die Einzelsubstanzen nicht so hoch dosiert werden müssen. Beispiele hierfür sind die

Polychemotherapien in der Onkologie oder die Kombination aus Interferon- α und Ribavirin zur Therapie der chronischen Hepatitis C. Butyrat kombiniert mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Gaschott et al. 2001), Mevastatin (Wachtershauser et al. 2001) oder 5-FU (Bras-Goncalves et al. 2001) hat verstärkte antiproliferative oder differenzierungsfördernde Effekte auf kolorektale Karzinomzelllinien oder Xenografts in Mäusen. Auch Sulindac, ein nicht-steroidales Antirheumatikum, in Kombination mit einem Inhibitor der EGFR-Kinase (epidermal growth factor receptor kinase) wirkt in einem APC-Maus Model synergistisch auf die Verhinderung der Entwicklung von kolorektalen Polypen (Torrance et al. 2000).

Die in dieser Arbeit untersuchte Kombination aus Butyrat und Acetylsalicylsäure könnte gerade über die synergistische Induktion von p21 auch *in vivo* die Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms vermindern.

6. Zusammenfassung

Epidemiologische Studien zeigen, daß eine regelmäßige Einnahme von Acetylsalicylsäure und eine ballaststoffreiche Ernährung die Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms senken. Ein Großteil der protektiven Ballaststoffeffekte wird der kurzkettigen Fettsäure Butyrat zugeschrieben, die durch bakterielle Fermentation von nicht-resorbierbaren Kohlenhydraten im Kolon entsteht. *In vitro*-Versuche zeigen, daß Acetylsalicylsäure und Butyrat die Proliferation von Kolonkarzinomzellen vermindern, Apoptose induzieren und den Differenzierungsgrad erhöhen. Der genaue molekulare Mechanismus dieser Wirkungen ist noch nicht bekannt. Darüberhinaus hat eine Kombination aus Acetylsalicylsäure und Butyrat additive Effekte auf Apoptose und Proliferation in Kolonkarzinomzellen.

In dieser Arbeit wurden zellzyklus- und apoptoseregulierende Faktoren auf ihre Modulation durch Acetylsalicylsäure und Butyrat alleine und in Kombination untersucht. Hierfür wurde zunächst als Screening-Methode die mRNA-Expression von 1176 Faktoren in HT-29 Kolonkarzinomzellen nach Inkubation mit Butyrat mittels eines cDNA Expression Arrays untersucht. Mit Hilfe RNase Protection Assays und Western Blot-Analysen wurden ausgewählte Faktoren der Apoptose- und Zellzykluskontrolle weitergehend untersucht.

Im cDNA Expression Array konnten 19 Faktoren beschrieben werden, die durch Butyrat induziert, sowie 22 Faktoren, deren Expression durch Butyrat vermindert wurde. Nähere Untersuchungen weiterer Faktoren zeigten Veränderungen der Expression von bcl-x₁, p53, c-fos, CDK4, P1SSLRE und p21. Acetylsalicylsäure induziert erst in höherer Konzentration (5mM) die Expression von p21, p27, GADD45 und reduziert die Expression von CDK4. Nach Inkubation der Zellen mit einer ASS/Butyrat-Kombination kam es zu einer deutlich höheren p21-Induktion als nach Inkubation mit Acetylsalicylsäure und Butyrat alleine. Zellzyklusanalysen zeigten, daß Butyrat und Acetylsalicylsäure (1-3mM) einen G₀/G₁-Arrest von HT-29 Zellen induziert, während Acetylsalicylsäure 5mM paradoxerweise den Anteil der Zellen in der S-Phase erhöhte.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Butyrat durch Modulation der Expression einer Vielzahl von Faktoren die antineoplastischen Wirkungen auf Kolonkarzinomzellen

bewirkt. Für ASS konnten nur in höheren Konzentrationen (5mM) Veränderungen von zellzyklusregulierenden Faktoren nachgewiesen werden. Die verstärkten Wirkungen einer ASS/Butyrat-Kombination *in vitro* können zumindest zum Teil durch die synergistische Induktion der p21-Expression erklärt werden.

Die Prävention des kolorektalen Karzinoms durch Acetylsalicylsäure sowie durch eine ballaststoffreiche Ernährung könnte auch *in vivo* durch eine Kombination aus beiden deutlich verstärkt werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
But	Butyrat
CDK	cyclin-dependent kinase
Cox	Cyclooxygenase
cpm	counts per minute
dATP	2`desoxyadenosin 5`triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`desoxy-Nucleosidtriphosphat
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat- H ₂ O
dH ₂ O	destilliertes H ₂ O
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes H ₂ O
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykolbis-(aminoethylether)-tetraacetat
FA	Formaldehyd
FBS	Fetales Rinderseum
HRP	Merrettichperoxidase (horseradishperoxidase)
mA	milliampere
MMLV	moloney murine leukemia virus
MOPS	3-Morpholinopropansulfat
NEAA	non-essential aminon acids
NSAID	non steroidal anti-inflammatory drug
PBS	phosphate buffered saline
PG	Prostaglandin
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis
SSC	saline sodium citrate
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamid
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan
V	Volt

8. Literaturverzeichnis

- Abe, N, Watanabe, T, Sugiyama, M, Uchimura, H, Chiapetta, G, Fusco, A, Atomi, Y (1999). "Determination of high mobility group I(Y) expression levels in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker." Cancer Research **59**: 1169-1174.
- Agarwal, ML, Taylor, WR, Chernov, MV, Chernova, OB, Stark, GR (1998). "The p53 network." J Biol Chem **273**(1): 1-4.
- Aharinejad, S, Abraham, D, Paulus, P, Abri, H, Hofmann, M, Grossschmidt, K, Schafer, R, Stanley, ER, Hofbauer, R (2002). "Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice." Cancer Res **62**(18): 5317-24.
- Akagi, Y, Liu, W, Xie, K, Zebrowski, B, Shaheen, RM, Ellis, LM (1999). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1beta." Br J Cancer **80**(10): 1506-1511.
- Alberts, DS, Martinez, ME, Roe, DJ, Guillen-Rodriguez, JM, Marshall, JR, van Leeuwen, JB, Reid, ME, Ritenbaugh, C, Vargas, PA, Bhattacharyya, AB, Earnest, DL, Sampliner, RE (2000). "Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network." N Engl J Med **342**(16): 1156-1162.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002.
- Arber, N, Hibshoosh, H, Moss, SF, Sutter, T, Zhang, Y, Begg, M, Wang, S, Weinstein, IB, Holt, PR (1996). "Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis." Gastroenterology **110**(3): 669-674.
- Archer, SY, Johnson, J, Meng, S, Hodin, RA (2000). "Downregulation of cyclin B1 by histone hyperacetylation during enterocyte differentiation." Gastroenterology: (Abst).
- Archer, SY, Meng, S, Shei, A, Hodin, RA (1998). "p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6791-6796.
- Barnard, JA, Warwick, G (1993). "Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells." Cell Growth Differ **4**(6): 495-501.
- Barnes, CJ, Lee, M (1998). "Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin." Gastroenterology **114**(5): 873-877.
- Bartkova, J, Lukas, J, Strauss, M, Bartek, J (1994). "The Prad-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas." Int J Cancer **58**(4): 568-573.
- Basson, MD, Emenaker, NJ, Hong, F (1998). "Differential modulation of human (Caco-2) colon cancer cell line phenotype by short chain fatty acids." Proc Soc Exp Biol Med **217**(4): 476-483.
- Bedi, A, Pasricha, P, Akthar, A, Barber, J, Bedi, G, Giardiello, F, Zehnauer, B, Hamilton, S, Jones, R (1995). "Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer." Cancer Res **55**: 1811-1816.
- Beg, AA, Baltimore, D (1996). "An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death." Science **274**(5288): 782-784.

- Bidon, N, Brichory, F, Thomas, D, Cavalier, A, Caulet-Maugendre, S, Bourguet, P, Dazord, L (2001). "Sodium butyrate induces growth inhibition and modulates galectin-8 expression in human lung carcinoma cells." Anticancer Res **21**(2A): 1049-1055.
- Blagosklonny, MV, Schulte, TW, Nguyen, P, Mimnaugh, EG, Trepel, J, Neckers, L (1995). "Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1." Cancer Res **55**(20): 4623-4626.
- Bohmann, D, Bos, TJ, Admon, A, Nishimura, T, Vogt, PK, Tjian, R (1987). "Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural und functional properties of transcription factor AP-1." Science **238**(1386-92).
- Bouvet, M, Ellis, LM, Nishizaki, M, Fujiwara, T, Liu, W, Bucana, CD, Fang, B, Lee, JJ, Roth, JA (1998). "Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer." Cancer Research **58**: 2288-2292.
- Bras-Goncalves, RA, Pocard, M, Formento, JL, Poirson-Bichat, F, De Pinieux, G, Pandrea, I, Arvelo, F, Ronco, G, Villa, P, Coquelle, A, Milano, G, Lesuffleur, T, Dutrillaux, B, Poupon, MF (2001). "Synergistic efficacy of 3n-butyrate and 5-fluorouracil in human colorectal cancer xenografts via modulation of DNA synthesis." Gastroenterology **120**(4): 874-888.
- Brockman, JA, Gupta, RA, Dubois, RN (1998). "Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells." Gastroenterology **115**(5): 1049-1055.
- Büchle, T, Grothey, A, Schmol, H-J (2000). "Neue Perspektiven mit neuen Zytostatika in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms." Onkologe **6**: 410-419.
- Burkitt, DP (1971). "Epidemiology of cancer of the colon and rectum." Cancer **28**(1): 3-13.
- Burri, N, Shaw, P, Bouzourene, H, Sordat, I, Sordat, B, Gillet, M, Schorderet, D, Bosman, FT, Chaubert, P (2001). "Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer." Lab Invest **81**(3): 217-29.
- Caligo, MA, Cipollini, G, Fiore, L, Calvo, S, Basolo, F, Collecchi, P, Ciardiello, F, Pepe, S, Petrini, M, Bevilacqua, G (1995). "NM23 gene expression correlates with cell growth rate and S-phase." Int J Cancer **60**(6): 837-42.
- Carethers, JM, Pham, TT (2000). "Mutations of transforming growth factor beta 1 type II receptor, BAX, and insulin-like growth factor II receptor genes in microsatellite unstable cell lines." In Vivo **14**(1): 13-20.
- Chai, F, Evdokiou, A, Young, GP, Zalewski, PD (2000). "Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate." Carcinogenesis **21**(1): 7-14.
- Chang, B-D, Watanabe, K, Broude, EV, Fang, J, Poole, JC, Kalinichenko, TV, Roninson, IB (2000). "Effects of p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases." PNAS **97**(8): 4291-4296.
- Chu, KU, Ishizuka, J, Battey, JF, Uchida, T, Beauchamp, RD, Townsend, CM, Jr., Thompson, JC (1996). "Mechanisms of bombesin on growth of gastrinoma (PT) in vivo." Dig Dis Sci **41**(11): 2180-6.
- Chiappetta, G, Manfioletti, G, Pentimalli, F, Abe, N, Di Bonito, M, Vento, MT, Giuliano, A, Fedele, M, Viglietto, G, Santoro, M, Watanabe, T, Giancotti, V, Fusco, A (2001). "High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases." Int J Cancer **91**(2): 147-151.

- Chinnaiyan, AM, O'Rourke, K, Lane, BR, Dixit, VM (1997). "Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death." Science **275**(5303): 1122-6.
- Chung, DC (2000). "The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis." Gastroenterology **119**: 854-865.
- Compher, CW, Frankel, WL, Tazelaar, J, Lawson, JA, McKinney, S, Segall, S, Kinoshian, BP, Williams, NN, Rombeau, JL (1999). "Wheat bran decreases aberrant crypt foci, preserves normal proliferation, and increases intraluminal butyrate levels in experimental colon cancer." JPEN J Parenter Enteral Nutr **23**(5): 269-277; discussion 277-268.
- Coradini, D, Pellizzaro, C, Marimpietri, D, Abolafio, G, Daidone, MG (2000). "Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells." Cell Prolif **33**(3): 139-146.
- Crew, TE, Elder, DJ, Paraskeva, C (2000). "A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate." Carcinogenesis **21**(1): 69-77.
- Cummings, JH, Pomare, EW, Branch, WJ, Naylor, CP, Macfarlane, GT (1987). "Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood." Gut **28**: 1221-1227.
- Daemi, N, Thomasset, N, Lissitzky, J-C, Dumortier, J, Jacquier, M-F, Pourreyron, C, Rousselle, P, Chayvialle, J-A, Remy, L (2000). "Anti-beta4 integrin antibodies enhance migratory and invasive abilities of human colon adenocarcinoma cells and their mmp-2 expression." Int J Cancer **85**: 850-856.
- Dai, CY, Furth, EE, Mick, R, Koh, J, Takayama, T, Niitsu, Y, Enders, GH (2000). "p16^{INK4a} expression begins early in human colon neoplasia and correlates inversely with markers of cell proliferation." Gastroenterology **119**: 929-942.
- Dameron, KM, Volpert, OV, Tainsky, MA, Bouck, N (1994). "Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1." Science **265**: 1582-1584.
- Dang, C (1991). "c-Myc oncoprotein function." Biochim Biophys Acta **1072**: 103-113.
- Della Ragione, F, Criniti, V, Della Pietra, V, Borriello, A, Oliva, A, Indaco, S, Yamamoto, T, Zappia, V (2001). "Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity." FEBS Lett **499**(3): 199-204.
- Demary, K, Wong, L, Spanjaard, RA (2001). "Effects of retinoic acid and sodium butyrate on gene expression, histone acetylation and inhibition of proliferation of melanoma cells." Cancer Lett **163**(1): 103-107.
- Demetrick, DJ, Zhang, H, Beach, DH (1996). "Chromosomal mapping of the human genes CKS1 to 8q21 and CKS2 to 9q22." Cytogenet Cell Genet **73**(3): 250-4.
- Dittmer, D, Pati, S, Zambetti, G, Chu, S, Teresky, AK, Moore, M, Finlay, C, Levine, AJ (1993). "Gain of function mutations in p53." Nat Genet **4**(1): 42-46.
- Dogliani, C, Pelosio, P, Laurino, L, et al. (1996). "p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation." J Pathol **179**: 248-253.
- DuBois, R, Gupta, R, Brockman, J, Reddy, B, Krakow, S, Lazar, M (1998). "The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers." Carcinogenesis **19**(1): 49-53.

- DuBois, RN, Radhika, A, Reddy, BS, Entingh, AJ (1996). "Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors." Gastroenterology **110**(4): 1259-1262.
- Eberhart, CE, Coffey, RJ, Radhika, A, Giardiello, FM, Ferrenbach, S, DuBois, RN (1994). "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." Gastroenterology **107**(4): 1183-1188.
- Edwards, MC, Wong, C, Elledge, SJ (1998). "Human cyclin K, a novel RNA polymerase II-associated cyclin possessing both carboxy-terminal domain kinase and Cdk-activating kinase activity." Mol Cell Biol **18**(7): 4291-300.
- El-Deiry, WS, Harper, JW, O'Connor, PM, Velculescu, VE, Canman, CE, Jackman, J, Pietenpol, JA, Burrell, M, Hill, DE, Wang, Y, et al. (1994). "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis." Cancer Res **54**(5): 1169-1174.
- El-Deiry, WS, Tokino, T, Velculescu, VE, Levy, DB, Parsons, R, Trent, JM, Lin, D, Mercer, WE, Kinzler, KW, Vogelstein, B (1995). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**: 817-825.
- Elder, DJ, Hague, A, Hicks, D, Paraskeva, C (1996). "Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines: enhanced apoptosis in carcinoma and in vitro-transformed adenoma relative to adenoma cell lines." Cancer Res **56**: 2273-2276.
- Elder, DJ, Halton, DE, Hague, A, Paraskeva, C (1997). "Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (Cox-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from Cox-2 protein expression." Clin Cancer Res **3**: 1679-1683.
- Emenaker, NJ, Calaf, GM, Cox, D, Basson, MD, Qureshi, N (2001). "Short-Chain Fatty Acids Inhibit Invasive Human Colon Cancer by Modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, Mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA Protein Expression in an In Vitro Cell Culture Model." J Nutr **131**(11): 3041S-3046S.
- Esworthy, RS, Swiderek, KM, Ho, YS, Chu, FF (1998). "Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine." Biochim Biophys Acta **1381**: 213-226.
- Etzrodt, G, Luhrs, H, Kreth, F, Kelber, E, Melcher, R, Gostner, A, Schaubert, J, Scheppach, W, Menzel, T (2002). "Butyrat senkt die Expression von VEGF in kolorektalen Karzinomzellen." Med Klin Abstract Band I: 71.
- Evers, BM, Ko, TC, Li, J, Thompson, EA (1996). "Cell cycle protein suppression and p21 induction in differentiating Caco-2 cells." Am J Physiol **271**(4 Pt 1): G722-727.
- Fearon, ER, Vogelstein, B (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Fedele, M, Bandiera, A, Chiapetta, G, Battista, S, Viglietto, G, Manfioletti, G, Casamassimi, A, Santoro, M, Giancotti, V, Fusco, A (1996). "Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMG(Y) proteins." Cancer Research **56**: 1896-1901.
- Flohil, CC, Janssen, PA, Bosman, FT (1996). "Expression of Bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas, and carcinomas of the colon." J Pathol **178**(4): 393-397.
- Fogh, J (1975). Human tumor cells in vitro. New York, Plenum Press: 115-159.
- Fuchs, CS, Giovannucci, EL, Colditz, GA, Hunter, DJ, Stampfer, MJ, Rosner, B, Speizer, FE, Willett, WC (1999). "Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women." N Engl J Med **340**(3): 169-176.

- Garrido, C, Gurbuxani, S, Ravagnan, L, Kroemer, G (2001). "Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death." Biochem Biophys Res Commun **286**(3): 433-42.
- Gartel, AL, Serfas, MS, Gartel, M, Goufman, E, Wu, GS, el-Deiry, WS, Tyner, AL (1996). "p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line." Exp Cell Res **227**(2): 171-181.
- Gaschott, T, Wachtershauser, A, Steinhilber, D, Stein, J (2001). "1,25-Dihydroxycholecalciferol enhances butyrate-induced p21(Waf1/Cip1) expression." Biochem Biophys Res Commun **283**(1): 80-85.
- Giardiello, FM, Hamilton, SR, Krush, AJ, Piantadosi, S, Hylind, LM, Celano, P, Booker, SV, Robinson, CR, Offerhaus, GJ (1993). "Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis." New Engl J Med **328**(18): 1313-1316.
- Giovannucci, E, Egan, KM, Hunter, DJ, Stampfer, MJ, Colditz, GA, Willett, WC, Speizer, FE (1995). "Aspirin and the risk of colorectal cancer in women." N Engl J Med **333**(10): 609-614.
- Giovannucci, E, Rimm, E, Stampfer, M, Colditz, G, Ascherio, A, Willett, W (1994). "Aspirin use and the risk for colorectal cancer in male health professionals." Ann Int Med **121**(4): 241-246.
- Goldberg, Y, Nassif, II, Pittas, A, Tsai, LL, Dynlacht, BD, Rigas, B, Shiff, SJ (1996). "The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle- regulatory proteins." Oncogene **12**(4): 893-901.
- Gope, R, Gope, ML (1993). "Effect of sodium butyrate on the expression of retinoblastoma (RB1) and P53 gene and phosphorylation of retinoblastoma protein in human colon tumor cell line HT29." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **39**(6): 589-597.
- Granville, DJ, Carthy, CM, Hunt, DW, McManus, BM (1998). "Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease." Lab Invest **78**(8): 893-913.
- Green, DR, Reed, JC (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-1312.
- Grunstein, M (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature **389**(6649): 349-352.
- Hague, A, Diaz, GD, Hicks, DJ, Krajewski, S, Reed, JC, Paraskeva, C (1997). "bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis." Int J Cancer **72**(5): 898-905.
- Hague, A, Manning, AM, Hanlon, KA, Huschtscha, LI, Hart, D, Paraskeva, C (1993). "Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer." Int J Cancer **55**(3): 498-505.
- Hague, A, Paraskeva, C (1995). "The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines." Eur J Cancer Prev **4**(5): 359-364.
- Hague, A, Singh, B, Paraskeva, C (1997). "Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate." Gastroenterology **112**(3): 1036-1040.
- Hanif, R, Pittas, A, Feng, Y, Koutsos, MI, Qiao, L, Staiano-Coico, L, Shiff, SI, Rigas, B (1996). "Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin- independent pathway." Biochem Pharmacol **52**(2): 237-245.
- Hao, X, Bishop, AE, Wallace, M, Wang, H, Willcocks, TC, Maclouf, J, Polak, JM, Knight, S, Talbot, IC (1999). "Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis." J Pathol **187**(3): 295-301.

- Harrison, LE, Wang, QM, Studzinski, GP (1999). "Butyrate-induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity." Proc Soc Exp Biol Med **222**(2): 150-156.
- Heerdt, BG, Houston, MA, Augenlicht, LH (1994). "Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines." Cancer Res **54**(12): 3288-3293.
- Heerdt, BG, Houston, MA, Augenlicht, LH (1997). "Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function." Cell Growth Differ **8**(5): 523-532.
- Herman, JG, Umar, A, Polyak, K, Graff, JR, Ahuja, N, Issa, JP, Markowitz, S, Willson, JK, Hamilton, SR, Kinzler, KW, Kane, MF, Kolodner, RD, Vogelstein, B, Kunkel, TA, Baylin, SB (1998). "Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6870-5.
- Hinnebusch, BF, Meng, S, Wu, JT, Archer, SY, Hodin, RA (2002). "The effects of short-chain Fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation." J Nutr **132**(5): 1012-7.
- Hirai, H, Maru, Y, Hagiwara, K, Nishida, J, Takaku, F (1987). "A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene." Science **238**(4834): 1717-20.
- Hoehn, GT, Stokland, T, Amin, S, Ramirez, M, Hawkins, AL, Griffin, CA, Small, D, Civin, CI (1996). "Tnk1: a novel intracellular tyrosine kinase gene isolated from human umbilical cord blood CD34+/Lin-/CD38- stem/progenitor cells." Oncogene **12**(4): 903-13.
- Holland, TA, Elder, J, McCloud, JM, Hall, C, Deakin, M, Fryer, AA, Elder, JB, Hoban, PR (2001). "Subcellular localisation of cyclin D1 protein in colorectal tumours is associated with p21(WAF1/CIP1) expression and correlates with patient survival." Int J Cancer **95**(5): 302-306.
- Howe, GR, Benito, E, Castelleto, R, Cornee, J, Esteve, J, Gallagher, RP, Iscovich, JM, Deng-ao, J, Kaaks, R, Kune, GA, et al. (1992). "Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies." J Natl Cancer Inst **84**: 1887-1896.
- Iacomino, G, Tecce, MF, Grimaldi, C, Tosto, M, Russo, GL (2001). "Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate." Biochem Biophys Res Commun **285**(5): 1280-1289.
- Iizaka, M., Furukawa, Y., Tsunoda, T., Akashi, H., Ogawa, M., Nakamura, Y. (2002). "Expression profile analysis of colon cancer cells in response to sulindac or aspirin." Biochem Biophys Res Commun **292**(2): 498-512.
- Inan, MS, Rasoulpour, RJ, Yin, L, Hubbard, AK, Rosenberg, DW, Giardina, C (2000). "The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line." Gastroenterology **118**(4): 724-734.
- Kacinski, BM (1995). "CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer." Ann Med **27**(1): 79-85.
- Kasten, M, Giordano, A (2001). "Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity." Oncogene **20**(15): 1832-8.
- Kharbanda, S, Pandey, P, Schofield, L, Israels, S, Roncinske, R, Yoshida, K, Bharti, A, Yuan, ZM, Saxena, S, Weichselbaum, R, Nalin, C, Kufe, D (1997). "Role for bcl-xL as an inhibitor of

- cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis." Proc Natl Acad Sci **94**(13): 6939-6942.
- Kim, DH, Park, YS, Park, CJ, Son, KC, Nam, ES, Shin, HS, Ryu, JW, Kim, DS, Park, CK, Park, YE (1999). "Expression of the HMGI(Y) gene in human colorectal cancer." Int J Cancer **84**(4): 376-380.
- Kim, JS, Crooks, H, Dracheva, T, Nishanian, TG, Singh, B, Jen, J, Waldman, T (2002). "Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells." Cancer Res **62**(10): 2744-8.
- Kishima, Y, Yoshida, K, Enomoto, H, Yamamoto, M, Kuroda, T, Okuda, Y, Uyama, H, Nakamura, H (2002). "Antisense oligonucleotides of hepatoma-derived growth factor (HDGF) suppress the proliferation of hepatoma cells." Hepatogastroenterology **49**(48): 1639-44.
- Kitayama, J, Nagawa, H, Nakayama, H, Tuno, N, Shibata, Y, Muto, T (1999). "Functional expression of beta1 and beta2 integrins on tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer." J Gastroenterol **34**(3): 327-33.
- Kluck, RM, Bossy-Wetzell, E, Green, DR, Newmeyer, DD (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-1136.
- Ko, LJ, Prives, C (1996). "p53: puzzle and paradigm." Genes Dev **10**(9): 1054-1072.
- Kojima, S, Kobayashi, A, Gotoh, O, Ohkuma, Y, Fujii-Kuriyama, Y, Sogawa, K (1997). "Transcriptional activation domain of human BTEB2, a GC box-binding factor." J Biochem (Tokyo) **121**(2): 389-96.
- Kondoh, N, Schweinfest, CW, Henderson, KW, Papas, TS (1992). "Differential expression of S19 ribosomal protein, laminin-binding protein, and human lymphocyte antigen class I messenger RNAs associated with colon carcinoma progression and differentiation." Cancer Res **52**(4): 791-6.
- Kopp, E, Ghosh, S (1994). "Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin." Science **265**(5174): 956-959.
- Krajewska, M, Moss, SF, Krajewski, S, Song, K, Holt, PR, Reed, JC (1996). "Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas." Cancer Res **56**(10): 2422-7.
- Kronborg, O, Fenger, C, Olsen, J, Jorgensen, OD, Sondergaard, O (1996). "Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test." Lancet **348**(9040): 1467-1471.
- Kune, GA, Kune, S, Watson, LF (1988). "Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study." Cancer **62**(9): 1962-1969.
- Lavelle, D, Chen, YH, Hankewych, M, DeSimone, J (2001). "Histone deacetylase inhibitors increase p21(WAF1) and induce apoptosis of human myeloma cell lines independent of decreased IL-6 receptor expression." Am J Hematol **68**(3): 170-178.
- Lehmann, J, Lenhard, J, Oliver, B, Ringold, G, Kliewer, S (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs." J Biol Chem **272**(6): 3406-3410.
- Li, H, Schut, HA, Conran, P, Kramer, PM, Lubet, RA, Steele, VE, Hawk, EE, Kelloff, GJ, Pereira, MA (1999). "Prevention by aspirin and its combination with alpha-difluoromethylornithine of azoxymethane-induced tumors, aberrant crypt foci and prostaglandin E2 levels in rat colon." Carcinogenesis **20**(3): 425-430.

- Li, P, Nijhawan, D, Budihardjo, I, Srinivasula, SM, Ahmad, M, Alnemri, ES, Wang, X (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.
- Li, S, MacLachlan, TK, De Luca, A, Claudio, PP, Condorelli, G, Giordano, A (1995). "The cdc-2-related kinase, PISLRE, is essential for cell growth and acts in G2 phase of the cell cycle." Cancer Res **55**(18): 3992-3995.
- Liang, G, Hai, T (1997). "Characterization of human activating transcription factor 4, a transcriptional activator that interacts with multiple domains of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein." J Biol Chem **272**(38): 24088-95.
- Litvak, DA, Evers, BM, Hwang, KO, Hellmich, MR, Ko, TC, Townsend, CM, Jr. (1998). "Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1." Surgery **124**(2): 161-169; discussion 169-170.
- Litvak, DA, Hwang, KO, Evers, BM, Townsend, CM, Jr. (2000). "Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate." Anticancer Res **20**(2A): 779-784.
- Luhrs, H, Gerke, T, Schaubert, J, Dusel, G, Melcher, R, Scheppach, W, Menzel, T (2001). "Cytokine-activated degradation of inhibitory kappaB protein alpha is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate." Int J Colorectal Dis **16**(4): 195-201.
- Luhrs, H, Hock, R, Schaubert, J, Weihrauch, M, Harrer, M, Melcher, R, Scheppach, W, Bustin, M, Menzel, T (2002). "Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells." Int J Cancer **97**(5): 567-73.
- Maclean, KN, McKay, IA, Bustin, SA (1998). "Differential effects of sodium butyrate on the transcription of the human TIS11 family of early-response genes in colorectal cancer cells." Br J Biomed Sci **55**(3): 184-191.
- Mariadason, JM, Corner, GA, Augenlicht, LH (2000). "Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer." Cancer Res **60**(16): 4561-4572.
- Martinez, ME, McPherson, RS, Levin, B (1995). "Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal adenomatous polyps among endoscoped individuals." Cancer Epidemiol Bio Prev **4**: 703-707.
- Matsushita, K, Kobayashi, S, Kato, M, Itoh, Y, Okuyama, K, Sakiyama, S, Isono, K (1996). "Reduced messenger RNA expression level of p21 CIP1 in human colorectal carcinoma tissues and its association with p53 gene mutation." Int J Cancer **69**(4): 259-64.
- McIntyre, A, Gibson, PR, Young, GP (1993). "Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model." Gut **34**(3): 386-391.
- Menzel, T, Schaubert, J, Kreth, F, Kudlich, T, Melcher, R, Gostner, A, Scheppach, W, Luhrs, H (2002). "Butyrate and aspirin in combination have an enhanced effect on apoptosis in human colorectal cancer cells." Eur J Cancer Prev **11**(3): 271-81.
- Meyerson, M, Enders, GH, Wu, CL, Su, LK, Gorka, C, Nelson, C, Harlow, E, Tsai, LH (1992). "A family of cdc2-related protein kinases." EMBO J. **11**: 2909-2917.
- Michalovitz, D, Halevy, O, Oren, M (1990). "Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53." Cell **62**(4): 671-680.

- Morgan, DO (1995). "Principles of CDK regulation." *Nature* **374**(6518): 131-134.
- Morgan, DO (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 261-291.
- Mörk, H, Al-Taie, OH, Bähr, K, Zierer, A, Beck, C, Scheurlen, M, Jakob, F, Köhrle, J (2000). "Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa." *Nutr Cancer* **37**(1): 108-116.
- Moss, S, Agarwal, B, Arber, N, Guan, R, Krajewska, M, Krajewski, S, Reed, J, Holt, P (1996). "Increased intestinal Bak expression results in apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 199-203.
- Muir, KR, Logan, RFA (1999). "Aspirin, NSAIDs and colorectal cancer - what do the epidemiological studies show and what do they tell us about the modus operandi?" *Apoptosis* **4**: 389-396.
- Muller, AD, Sonnenberg, A, Wasserman, IH (1994). "Diseases preceding colon cancer. A case control study among veterans." *Dig Dis Sci* **39**: 2480-84.
- Musholt, TJ, Goodfellow, PJ, Scheumann, GF, Pichlmayr, R, Wells, SA, Jr., Moley, JF (1997). "Differential display in primary and metastatic medullary thyroid carcinoma." *J Surg Res* **69**(1): 94-100.
- Nakano, K, Mizuno, T, Sowa, Y, Orita, T, Yoshino, T, Okuyama, Y, Fujita, T, Ohtani-Fujita, N, Matsukawa, Y, Tokino, T, Yamagishi, H, Oka, T, Nomura, H, Sakai, T (1997). "Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line." *J Biol Chem* **272**(35): 22199-22206.
- Naujokat, C, Hoffmann, S (2002). "Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis." *Lab Invest* **82**(8): 965-80.
- Oshima, M, Dinchuck, J, Kargman, S, Oshima, H, Hancock, B, Kwong, E, Trzaskos, J, Evans, J, Taketo, M (1996). "Suppression of intestinal polyposis in APC 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (Cox-2)." *Cell* **87**: 803-809.
- Ota, S, Tanaka, Y, Bamba, H, Kato, A, Matsuzaki, F (1999). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may prevent colon cancer through suppression of hepatocyte growth factor expression." *Eur J Pharmacol* **367**(1): 131-138.
- Palmer, D, Paraskeva, C, Williams, A (1997). "Modulation of p53 expression in cultured colonic adenoma cell lines by the naturally occurring luminal factors butyrate and deoxycholate." *Int J Cancer* **73**: 702-706.
- Pan, G, O'Rourke, K, Dixit, VM (1998). "Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex." *J Biol Chem* **273**(10): 5841-5845.
- Piazza, GA, Rahm, AL, Krutzsch, M, Sperl, G, Paranka, NS, Gross, PH, Brendel, K, Burt, RW, Alberts, DS, Pamukcu, R, et al. (1995). "Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis." *Cancer Res* **55**(14): 3110-3116.
- Podolsky, DK, Babyatsky, MW (1995). *Textbook of Gastroenterology (Yamada, T., Ed.)* **2**: 564-577.
- Polyak, K, Hamilton, SR, Vogelstein, B, Kinzler, KW (1996). "Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia." *Am J Pathol* **149**: 381-387.
- Potter, JD, McMichael, AJ, Hartshorne, JM (1982). "Alcohol and beer consumption in relation to cancers of bowel and lung: an extended correlation analysis." *J Chronic Dis* **35**(11): 833-842.

- Pugh, S, Thomas, G (1994). "Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2." Gut **35**: 675-678.
- Qiao, L, Hanif, R, Sphicas, E, Shiff, SJ, Rigas, B (1998). "Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells." Biochem Pharmacol **55**(1): 53-64.
- Qiao, L, Kozoni, V, Tsioulas, GJ, Koutsos, MI, Hanif, R, Shiff, SJ, Rigas, B (1995). "Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo." Biochim Biophys Acta **1258**: 215-223.
- Rabinowitz, I, Mercurio, AM (1996). "The integrin alpha 6 beta 4 and the biology of carcinoma." Biochem Cell Biol **74**: 811-821.
- Reed, JC (1997). "Double identity for proteins of the Bcl-2 family." Nature **387**(6635): 773-776.
- Reuther, GW, Pendergast, AM (1996). "The roles of 14-3-3 proteins in signal transduction." Vitam Horm **52**: 149-55.
- Ricchi, P, Pignata, S, Di Popolo, A, Memoli, A, Apicella, A, Zarrilli, R, Acquaviva, AM (1997). "Effect of aspirin on cell proliferation and differentiation of colon adenocarcinoma Caco-2 cells." Int J Cancer **73**(6): 880-884.
- Rigas, B, Goldman, IS, Levine, L (1993). "Altered eicosanoid levels in human colon cancer." J. Lab. Clin. Med. **122**: 518-523.
- Roediger, WE (1980). "Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man." Gut **21**(9): 793-798.
- Rouse, J, Cohen, P, Trigon, S, Morange, M, Alonso-Llamazares, A, Zamanillo, D, Hunt, T, Nebreda, AR (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." Cell **78**(6): 1027-37.
- Ruemmele, FM, Dionne, S, Qureshi, I, Sarma, DS, Levy, E, Seidman, EG (1999). "Butyrate mediates caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro- apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP- ribose) polymerase (PARP)." Cell Death Differ **6**(8): 729-735.
- Sandler, R (1996). "Epidemiology and risk factors for colorectal cancer." Gastroenterol Clin North Am **25**(4): 717-735.
- Sandler, RS, Galanko, JC, Murray, SC, Helm, JF, Woosley, JT (1998). "Aspirin and nonsteroidal antiinflammatory agents and risk for colorectal adenomas." Gastroenterology **114**: 441-447.
- Sano, H, Kawahito, Y, Wilder, RL, Hashiramoto, A, Mukai, S, Asai, K, Kimura, S, Kato, H, Kondo, M, Hla, T (1995). "Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer." Cancer Res **55**(17): 3785-3789.
- Sarraf, P, Mueller, E, Jones, D, King, FJ, DeAngelo, DJ, Partridge, JB, Holden, SA, Chen, LB, Singer, S, Fletcher, C, Spiegelman, BM (1998). "Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma." Nat Med **4**(9): 1046-1052.
- Schatzkin, A, Lanza, E, Corle, D, Lance, P, Iber, F, Caan, B, Shike, M, Weissfeld, J, Burt, R, Cooper, MR, Kikendall, JW, Cahill, J (2000). "Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group." N Engl J Med **342**(16): 1149-1155.
- Scheppach, W, Bartram, HP, Richter, F (1995). "Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer." Eur J Cancer **31A**(7-8): 1077-1080.

- Scheppach, W, Bartram, P, Richter, A, Richter, F, Liepold, H, Dusel, G, Hofstetter, G, Ruthlein, J, Kasper, H (1992). "Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro." JPEN J Parenter Enteral Nutr **16**(1): 43-48.
- Schwartz, B, Avivi-Green, C, Polak-Charcon, S (1998). "Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells." Mol Cell Biochem **188**(1-2): 21-30.
- Sealy, L, Chalkley, R (1978). "The effect of sodium butyrate on histone modification." Cell **14**: 115-121.
- Segain, JP, de La Bletiere, DR, Bourreille, A, Leray, V, Gervois, N, Rosales, C, Ferrier, L, Bonnet, C, Blottiere, HM, Galmiche, JP (2000). "Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease." Gut **47**(3): 397-403.
- Selby, JV, Friedman, GD, Quesenberry, CP, Jr., Weiss, NS (1992). "A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer." N Engl J Med **326**(10): 653-657.
- Sgambato, A, Cittadini, A, Faraglia, B, Weinstein, IB (2000). "Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review." J Cell Physiol **183**(1): 18-27.
- Sheikh, MS, Chen, YQ, Smith, ML, Fornace, AJ, Jr. (1997). "Role of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in cell death and DNA repair as studied using a tetracycline-inducible system in p53-deficient cells." Oncogene **14**(15): 1875-1882.
- Sherr, CJ, Roberts, JM (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-1512.
- Shibao, K, Takano, H, Nakayama, Y, Okazaki, K, Nagata, N, Izumi, H, Uchiumi, T, Kuwano, M, Kohno, K, Itoh, H (1999). "Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas." Int J Cancer **83**(6): 732-7.
- Shiff, SJ, Koutsos, MI, Qiao, L, Rigas, B (1996). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis." Exp Cell Res **222**(1): 179-188.
- Shiohara, M, El-Deiry, WS, Wada, M, Nakami, T, Takeuchi, S, Yang, R, Chen, DL, Vogelstein, B, Koeffler, HP (1994). "Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies." Blood **84**: 3781-3784.
- Siavoshian, S, Blottiere, HM, Cherbut, C, Galmiche, JP (1997). "Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **232**(1): 169-172.
- Siavoshian, S, Segain, JP, Kornprobst, M, Bonnet, C, Cherbut, C, Galmiche, JP, Blottiere, HM (2000). "Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression." Gut **46**(4): 507-514.
- Slebos, RJC, Baas, IO, Clement, M, Polak, M, Mulder, JW, van den Berg, FM, Hamilton, SR, Offerhaus, GJ (1996). "Clinical and pathological association with p53 tumor-suppressor gene mutations and expression of p21^{WAF1/CIP1} in colorectal carcinomas." Br J Cancer **74**: 165-171.
- Smith, WL, Garavito, RM, DeWitt, DL (1996). "Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2." J Biol Chem **271**(52): 33157-60.
- Souleimani, A, Asselin, C (1993). "Regulation of C-fos expression by sodium butyrate in the human colon carcinoma cell line Caco-2." Biochem Biophys Res Commun **193**(1): 330-336.
- Sowa, Y, Sakai, T (2000). "Butyrate as a model for "gene-regulating chemoprevention and chemotherapy."." Biofactors **12**(1-4): 283-287.

- Steinbach, G, Lynch, PM, Philipps, RKS, Wallace, MH, Hawk, E, Gordon, GB, Wakabayashi, N, Saunders, B, Shen, Y, Fujimura, T, Su, LK, Levin, B (2000). "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis." N Engl J Med **342**: 1946-1952.
- Steinman, RA, Hoffman, B, Iro, A, Guillouf, C, Liebermann, DA, el-Houseini, ME (1994). "Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation." Oncogene **9**(11): 3389-3396.
- Sturlan S, Oberhuber G, Beinhauer BG, Tichy B, Kappel S, Wang J, Rogy MA (2001). "Interleukin-10-deficient mice and inflammatory bowel disease associated cancer development." Carcinogenesis **22**(4): 665-71.
- Subb Gowda, R, Frommel, TO (1998). "Aspirin toxicity for human colonic tumor cells results from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest." Cancer Res **58**(13): 2772-2776.
- Sugimoto, A, Hozak, RR, Nakashima, T, Nishimoto, T, Rothman, JH (1995). "dad-1, an endogenous programmed cell death suppressor in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates." Embo J **14**(18): 4434-41.
- Takahashi, Y, Bucana, CD, Cleary, KR, Ellis, LM (1998). "p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer." Int J Cancer **79**(1): 34-38.
- Tan, S, Seow, TK, Liang, RC, Koh, S, Lee, CP, Chung, MC, Hooi, SC (2002). "Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29)." Int J Cancer **98**(4): 523-31.
- Thanos, D, Maniatis, T (1996). "The high mobility group protein HMG1(Y) is required for NF-kappaB-dependent virus induction of the human IFN-beta gene." Cell **71**: 777-789.
- Thun, M, Namboodiri, M, Heath, C (1991). "Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer." New Engl J Med **325**(23): 1593-1596.
- Torrance, CJ, Jackson, PE, Montgomery, E, Kinzler, KW, Vogelstein, B, Wissner, A, Nunes, M, Frost, P, Discafani, CM (2000). "Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia." Nat Med **6**(9): 1024-1028.
- Toscani, A, Soprano, DR, Soprano, KJ (1988). "Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest." Oncogene Res **3**(3): 223-238.
- Trock, B, Lanza, E, Greenwald, P (1990). "Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence." J Natl Cancer Inst **82**(8): 650-661.
- Tsuji, M, DuBois, RN (1995). "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2." Cell **83**(3): 493-501.
- Tsuji, M, Kawano, S, DuBois, R (1997). "Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential." Proc Natl Acad Sci **94**: 3336-3340.
- Tsuji, M, Kawano, S, Tsuji, S, Sawaoka, H, Hori, M, DuBois, RN (1998). "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells." Cell **93**(5): 705-716.
- Viale, G, Pellegrini, C, Mazzarol, G, Maisonneuve, P, Silverman, ML, Bosari, S (1999). "p21WAF1/CIP1 expression in colorectal carcinoma correlates with advanced disease stage and p53 mutations." J Pathol **187**(3): 302-307.
- Wachtershauser, A, Akoglu, B, Stein, J (2001). "HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line Caco-2." Carcinogenesis **22**(7): 1061-1067.

- Wachtershauser, A, Loitsch, SM, Stein, J (2000). "PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate." Biochem Biophys Res Commun **272**(2): 380-385.
- Weaver, GA, Krause, JA, Miller, TL, Wolin, MJ (1988). "Short chain fatty acid distributions of enema samples from a sigmoidoscopy population: an association of high acetate and low butyrate ratios with adenomatous polyps and colon cancer." Gut **29**(11): 1539-1543.
- Weber, F, Luhrs, H, Krott, K, Schaubert, J, Kelber, E, Scheppach, W, Menzel, T (2000). "Die butyratvermittelte Modulation von Proliferation und Differenzierung in Kolonkarzinomzellen ist mit einer vermehrten Expression von PPAR-gamma assoziiert." Aktuell Ernähr Med **25**: 113.
- Weinstein, IB (2000). "Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: The role of homeostasis." Carcinogenesis **21**(5): 857-864.
- Weihrauch, M, Menzel, T, Kreth, F, Kelber, E, Scheppach, W, Luhrs, H (2002). "Modulation of mRNA Expression of High Mobility Group (HMG) Proteins by the Short Chain Fatty Acid Butyrate in Human Gastrointestinal Carcinoma Cells." Abstract Band Falk Symposium #138: 52.
- Whitehead, RH, Young, GP, Bhatnagar, PS (1986). "Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215)." Gut **27**(12): 1457-1463.
- Willett, WC, Stampfer, MJ, Colditz, GA, Rosner, BA, Speizer, FE (1990). "Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women." N Engl J Med **323**(24): 1664-1672.
- Wong, MP, Cheung, N, Yuen, ST, Leung, SY, Chung, LP (1999). "Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression." Int J Cancer **81**(6): 845-850.
- Wu, JT, Archer, SY, Hinnebusch, B, Meng, S, Hodin, RA (2001). "Transient vs. prolonged histone hyperacetylation: effects on colon cancer cell growth, differentiation, and apoptosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(3): G482-490.
- Xiong, Y, Hannon, GJ, Zhang, H, Casso, D, Kobayashi, R, Beach, D (1993). "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases." Nature **366**(6456): 701-704.
- Yamamoto, H, Monden, T, Ikeda, K, Izawa, H, Fukuda, K, Fukunaga, M, Tomita, N, Shimano, T, Shiozaki, H, Monden, M (1995). "Coexpression of cdk2/cdc2 and retinoblastoma gene products in colorectal cancer." Br J Cancer **71**(6): 1231-1236.
- Yamamoto, H, Soh, JW, Shirin, H, Xing, WQ, Lim, JT, Yao, Y, Slosberg, E, Tomita, N, Schieren, I, Weinstein, IB (1999). "Comparative effects of overexpression of p27Kip1 and p21Cip1/Waf1 on growth and differentiation in human colon carcinoma cells." Oncogene **18**(1): 103-115.
- Yang, WL, Frucht, H (2001). "Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells." Carcinogenesis **22**(9): 1379-1383.
- Yoshida, M, Kijima, M, Akita, M, Beppu, T (1990). "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." J Biol Chem **265**: 17174-17179.
- Zhan, Q, Antinore, MJ, Wang, XW, Carrier, F, Smith, ML, Harris, CC, Fornace Jr, AJ (1999). "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein GADD45." Oncogene **18**: 2892-2900.
- Zhang, T, Nanney, LB, Luongo, C, Lamps, L, Heppner, KJ, DuBois, RN, Beauchamp, RD (1997). "Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk 4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (min) mice and human familial adenomatous polyposis patients." Cancer Res **57**(1): 169-175.

Danksagung

Mein Dank gilt an allererster Stelle Herrn Professor Dr. W. Scheppach für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des interessanten Themas.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. Thomas Menzel und Herrn Dr. Hardi Lührs für die fachliche Unterstützung und Betreuung.

Weiterhin bedanke ich mich bei Theodor Kudlich für die Einführung in die FACS-Methode.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Gastrolabors für die exzellente Arbeitsatmosphäre und Unterstützung während dieser Doktorarbeit. Dabei möchte ich besonders Kerstin Backhaus, Gerda Dusel, Elisabeth Kelber und Donata Kuhn hervorheben.

Ein ganz besonderer Dank geht hiermit an meine Frau Juli für die Unterstützung und Geduld während dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Florian Kreth
Anschrift: An der Verfassungslinde 7, 04103 Leipzig
Geburtsdatum/ -ort: 07.02.1974 in Göttingen
Konfession: evangelisch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1980 – 1984 Grundsule Lengfeld, Würzburg
1984 – 1993 Riemenschneider-Gymnasium Würzburg mit
Abschluß der Hochschulreife (Note: 1,7)

Zivildienst:

08/1993 – 10/1994 Zivildienst bei der Sozialstation des Diakonischen
Werkes Würzburg (Kranken- und Altenpflege)

Hochschulbildung:

11/1994 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
ab 5/1995 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
3/1997 Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,33)
3/1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: 2)
9/2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note:2)
10/2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note:2)

Praktisches Jahr:

23.10. – 11.02.2001 Neurologie, Neurolog. Universitätsklinik Würzburg
12.02. – 03.06.2001 Chirurgie, Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz
04.06. – 23.09.2001 Innere Medizin, Med. Poliklinik Würzburg

Berufliche Tätigkeit:

seit 12/2001 Arzt im Praktikum an der Medizinischen Klinik
und Poliklinik II (Direktor: Prof. Dr. med.
Mössner), Universität Leipzig

Leipzig, den 13.03.2003