

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Aus dem Zentrum für Lebensmittelwissenschaften
Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
- Lebensmitteltoxikologie -

**Präventive Effekte von konjugierten Linolsäureisomeren
und verzweigtkettigen Fettsäuren**

—————
**Die Rolle der nuklearen Rezeptoren PPAR
in der Kolonkarzinogenese**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Maren Leifheit

geboren am 20. März 1976 in Einbeck

Hannover 2006

Wissenschaftlicher Betreuer

Priv.-Doz. Dr. Dr. Alfonso Lampen

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Referenten der Dissertation

Prof. Dr. Walter H. Müller

Zentrum für Biochemie - Abt. Physiologische Chemie -
der Medizinischen Hochschule Hannover

Priv.-Doz. Dr. Dr. Alfonso Lampen

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Prüfungskollegium

Prof. Dr. Bernd Hitzmann (Vorsitzender)

Institut für Technische Chemie
der Universität Hannover

Prof. Dr. Walter H. Müller

Zentrum für Biochemie - Abt. Physiologische Chemie -
der Medizinischen Hochschule Hannover

Prof. Dr. Bernd Otto

Institut für Physiologische Chemie
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Priv.-Doz. Dr. Dr. Alfonso Lampen

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juni 2006

IN DANKBARKEIT MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzdarstellung der Arbeit (Short Summary)	1
2	Einleitung	9
2.1	Konjugierte Linolsäureisomere und verzweigtkettige Fettsäuren	9
2.2	Herkunft und Bildung der CLAs	10
2.3	Physiologische Bedeutung und Stoffwechselweg	11
2.4	Verzweigtkettige Fettsäuren	12
2.5	Peroxisomene Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)	14
2.6	Struktur eines Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors	16
2.7	Histondeacetylase-Inhibitoren in der Krebstherapie	17
2.8	Retinoid Rezeptoren	19
2.9	Kolonkarzinogenese	20
2.10	PPAR δ und seine Rolle in der Kolonkarzinogenese	23
2.11	Kolonkarzinome und Ernährung	25
2.12	Proliferation, Differenzierung und Expression von Markergenen	26
2.13	Apoptose	27
3	Arbeitshypothese und Zielsetzung	31
4	Material	35
4.1	Verwendete Geräte	35
4.2	Verbrauchsmaterialien	35
4.3	Laborhilfsmittel	35
4.4	Substanzen	36

4.5	Reagenzien und Chemikalien	36
4.5.1	Reagenzien und Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten	36
4.5.2	Reagenzien für die Zellkultur	37
4.5.3	Sonstige Chemikalien	37
4.6	Zelllinien	38
4.7	Rezeptorkonstrukte und Plasmide	39
4.7.1	Rezeptorkonstrukte	39
4.7.2	Plasmide	40
4.8	Semiquantitative RT-PCR	45
4.8.1	Untersuchte Gene für die Durchführung von Expressionsanalysen	45
4.8.2	Primer für Genexpressionsanalysen	46
5	Methoden	47
5.1	Zellbiologische Verfahren	47
5.1.1	Zellkultur unter Normalbedingungen	47
5.1.2	Einfrieren der Zellen	48
5.1.3	Auftauen von Zellen	48
5.1.4	Bestimmung der Zelldichte einer Suspension	48
5.2	Mikrobiologische Verfahren	49
5.2.1	Transformation von Bakterienzellen	49
5.3	Molekularbiologische Verfahren	50
5.3.1	Plasmidpräparation	50
5.3.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	50
5.4	Transfektionen	51
5.4.1	Transiente Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Präzipitation	51
5.4.2	Stabile Transfektion zur Generierung überexprimierender bzw. reprimierender PPAR δ Kolonzen	53
5.5	Enzymassays	54
5.5.1	Luciferase Assay	54
5.5.2	Alkalische Phosphatase Assay zur Bestimmung der <i>c-myc</i> Promotoraktivität	55
5.5.3	Proliferationsassay	56

5.6	Methoden zur Bestimmung der Differenzierung	58
5.6.1	Kultivierung der Caco-2 Zellen zur anschließenden Bestimmung des Differenzierungszustandes	58
5.6.2	Präparation der Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen nach SCHMITZ (modifiziert)	58
5.6.3	Proteinbestimmung nach Smith et al. (1985)	60
5.6.4	Enzymtest zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase als Marker für das Differenzierungsstadium von Caco-2 Zellen	61
5.6.5	Schritte zur Berechnung der spezifischen Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase	62
5.7	Studien zur Zytotoxizität und Apoptose	63
5.7.1	Neutralrot-Test	63
5.7.2	Acridin Orange-Färbung zur mikroskopischen Bestimmung des Apoptosestadiums mit Fettsäure behandelter Caco-2 wt Zellen und stabiler Caco-2 Klone	64
5.7.3	Kolorimetrische Bestimmung der Caspase-3 Aktivität als Apoptosemarker	65
5.8	Studien zur Genexpression	67
5.8.1	Gesamt-RNA-Präparation nach Chomczynski & Sacchi	67
5.8.2	RNA-Präparation mit Trizol	68
5.8.3	Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der RNA	69
5.8.4	Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA	70
5.8.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	71
5.8.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR): Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Oligonukleotiden	72
5.8.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	74
5.8.8	Densitometrische Auswertung	74
5.9	Proteinbiochemische Studien	75
5.9.1	Zellkulturbedingungen für Proteinnachweise im Western Blot	75
5.9.2	Cytosolpräparation	75
5.9.3	Kernextraktion	76
5.9.4	Gesamtzelllysat	76
5.9.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	77
5.9.6	Western Blot	79

5.9.7	Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen	79
5.9.8	Vakuumtrocknung von SDS-Gelen	80
5.9.9	Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen	80
5.9.10	Blocken und Antikörperfärbung	80
5.9.11	ECL-Entwicklung	81
5.9.12	Auswertung der detektierten Proteinbanden	82
5.10	Statistik	82
6	Ergebnisse	83
6.1	Zytotoxizitätsbestimmungen der einfach und mehrfach ungesättigten sowie der verzweigt-kettigen Fettsäuren	83
6.2	Einfach ungesättigte Fettsäuren (Trans-Vaccensäure)	84
6.2.1	PPAR δ -Aktivierung durch Trans-Vaccensäure	84
6.2.2	Proliferationsverlauf verschiedener Zelllinien nach Trans-Vaccensäure-Induktion	85
6.2.3	Trans-Vaccensäure und Differenzierung	86
6.2.3.1	Einfluss der Trans-Vaccensäure auf die intestinale Alkalische Phosphatase in der Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen	86
6.2.3.2	Promotorstudien zur IAP-Aktivität in Kolonkarzinomzellen nach Behandlung mit TVA	86
6.2.4	Trans-Vaccensäure und die Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ	88
6.3	Konjugierte Linolsäureisomere als Beispiel für mehrfach ungesättigte Fettsäuren	89
6.3.1	Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ (PPAR δ) durch konjugierte Linolsäureisomere	89
6.3.2	Aktivierung des Retinsäure Rezeptors und des Retinoid X Rezeptors durch CLA-Isomere in HEK293 Zellen	91
6.3.3	Genexpressionsstudien von PPAR δ in humanen HT29 Zellen	92
6.3.4	Proliferationsstudien	94
6.3.4.1	Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von konjugierten Linolsäureisomeren in humanen Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu einer embryonalen Teratokarzinom-Stammzelllinie der Maus	94
6.3.4.2	Synergistische Effekte von PPAR δ -Liganden und RXR-Aktivatoren im Bezug auf den Proliferationsverlauf von Caco-2 Zellen	97
6.3.4.3	Effekte der Linolsäureisomere 9Z,11E-CLA und 10E,12Z-CLA auf die Genexpression von postulierten Proliferationsgenen in intestinalen HT29 Zellen	98

6.3.4.4	Durch konjugierte Linolsäureisomere beeinflusste <i>c-myc</i> Promotoraktivität als Proliferationsmarker in HEK293 Zellen	103
6.3.4.5	Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf die AP1-Aktivität in HEK293 Zellen	104
6.3.5	Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf die Differenzierung	106
6.3.5.1	Spezifische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase zur Bestimmung der Differenzierung von Caco-2 Zellen durch langkettige Fettsäuren	106
6.3.5.2	Promotorstudien der Intestinalen Alkalischen Phosphatase in Caco-2 Zellen	107
6.3.5.3	Reporterassays zur Bestimmung der Aktivität von CEA, SI und iFABP als Differenzierungsmarker in Caco-2 Zellen	108
6.3.6	Der APC- β -catenin-TCF-4 Signalweg in der Kolonkarzinogenese	111
6.3.6.1	Untersuchungen zur Aufklärung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges in Caco-2 Zellen	111
6.3.7	Effekte der Fettsäuren auf Marker der Zelladhäsion	117
6.3.7.1	Zeit- und konzentrationsabhängige <i>β-catenin</i> mRNA-Expressions in induzierten HT29 Zellen	118
6.3.7.2	Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf das β -catenin Protein in HT29 Zellen	121
6.4	Konjugierte Linolsäureisomere und die Rolle von PPARδ	123
6.4.1	Generierung von Caco-2 Zellklonen, die hPPAR δ überexprimieren bzw. die hPPAR δ Expression reprimieren	123
6.4.2	Nachweis zur stabilen Transfektion von Caco-2 Klonen	124
6.4.2.1	Transfektionen mit PPRE zum Nachweis der Stabilität von Caco-2 hPPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Klonen	124
6.4.2.2	Nachweis von hPPAR δ in stabilen Caco-2 Klonen auf Proteinebene	125
6.4.3	Vergleichende Proliferationsstudien der hPPAR δ Caco-2 Klone	127
6.4.3.1	Proliferationsverlauf der stabil transfizierten Caco-2 Klone nach CLA-Behandlung zur Untersuchung der Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ	127
6.4.3.2	Untersuchungen zur Genexpression von Proliferationsgenen in Caco-2 Klonen unter Berücksichtigung konzentrationsabhängiger CLA-Behandlung	129
6.4.4	Die Rolle von PPAR δ in der Differenzierungsphase von mit 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA induzierten Caco-2 Zellen	131
6.4.5	Einfluss des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors PPAR δ auf die Zelladhäsion von Kolonkarzinomzellen	133
6.4.5.1	Genexpressionsprofile von <i>β-catenin</i> in Caco-2 wt Zellen und PPAR δ -Klonen	133

6.4.6	PPAR δ und seine Bedeutung in der Apoptose	135
6.4.6.1	Unterschiede in der Caspase-3 Aktivität von durch 10E,12Z-CLA induzierten Caco-2 Klonen	135
6.4.6.2	Wirkung des 10E,12Z-Isomers der Linolsäure auf die Chromatinstruktur von Caco-2 wt Zellen und PPAR δ -Klonen durch Acridine Orange-Färbung	136
6.5	Vergleichende Studien von PPARδ in HCT116 Zelllinien	139
6.5.1	Proliferation von HCT116 Zelllinien zur Identifizierung der Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ unter Einfluss von konjugierten Linolsäureisomeren in der Kolonkarzinogenese	139
6.5.2	Differenzierte Genexpression in der Proliferationsphase von induzierten HCT116 Zelllinien	141
6.6	Verzweigtkettige Fettsäuren	145
6.6.1	Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ durch verzweigtkettige Fettsäuren	145
6.6.2	Genexpressionsstudien von <i>PPARδ</i> in mit Phytansäure behandelten HT29 Zellen	146
6.6.3	Effekte der Phytansäure auf das PPAR δ Protein in HT29 Zellen	147
6.6.4	Proliferationsstudien von Phytansäure-beeinflusster Kolonkarzinomzellen	148
6.6.4.1	Durch verzweigtkettige Fettsäuren beeinflusster Proliferationsverlauf verschiedener Zelllinien	148
6.6.4.2	Effekte der Phytansäure auf die Genexpression bekannter Proliferationsgene in HT29 Zellen	149
6.6.4.3	Durch Phytansäure veränderte Aktivität von <i>myc</i> und <i>AP-1</i>	151
6.6.5	Verzweigtkettige Fettsäuren und Differenzierung	153
6.6.5.1	Spezifische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase zur Bestimmung der Differenzierung von Caco-2 Zellen durch verzweigtkettige Fettsäuren	153
6.6.5.2	Promotorstudien zur IAP-Aktivität in mit Phytansäure behandelten Caco-2 Zellen	154
6.6.5.3	Reporterassays zur Aufklärung des Einflusses von Phytansäure auf die Differenzierungsmarker SI, CEA und iFABP in Caco-2 Zellen	155
6.6.6	Einfluss der Phytansäure auf die Zelladhäsion von Kolonzellen	157
6.6.6.1	Phytansäureeffekte auf die Expression von <i>β-catenin</i> in HT29 Zellen	157
6.6.6.2	Das <i>β-catenin</i> Protein unter Einfluss von Phytansäure	158
6.6.7	PPAR δ unter dem Einfluss von Phytansäure	159
6.6.7.1	Proliferationsverlauf der Caco-2 PPAR δ - Klone nach Behandlung mit Phytansäure	159

7	Diskussion	161
7.1	Auswahl von Lebensmittelinhaltsstoffen als Modellsubstanzen	162
7.2	Zellkultursysteme zur Beurteilung der Wirkungsmechanismen von Modellsubstanzen	164
7.3	Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors delta (PPARδ) durch Modellsubstanzen	166
7.4	Proliferationsstudien von Karzinomzelllinien unter Einfluss der Modellsubstanzen	167
7.5	Analyse des toxischen Potentials der Modellsubstanzen	169
7.6	Untersuchung der Expression von Markergenen der Proliferation	169
7.7	Wirkungen der Modellsubstanzen auf die Differenzierung	172
7.8	Analyse der β-Catenin-TCF-4 Signalkaskade	174
7.9	Expressionsprofile des Zelladhäsionsmoleküls β-Catenin	177
7.10	Proteinbiochemische Untersuchungen zur Zelladhäsion	178
7.11	Einfluss der Modellsubstanzen auf den nukleären Rezeptor PPARδ	179
7.11.1	<i>PPARδ</i> Expression in HT29 Zellen	180
7.11.2	Generation von Caco-2 PPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Klonen	181
7.11.2.1	Proliferationsvergleiche der Caco-2 Klone	181
7.11.2.2	Genexpressionsstudien der Targets des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges in PPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Caco-2 Klonen	183
7.11.2.3	Einfluss von PPAR δ auf die Differenzierung der Caco-2 Klone	184
7.11.2.4	Bedeutung der Apoptose in der Kolonkarzinogenese	185
7.11.3	Vergleich der Zellproliferation und Expression von Targetgenen in nicht transformierten HCT116 Zellen	187
7.12	Effekte der Heterodimerbildung von PPARδ und RXR	188
7.13	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	189

8	Literaturverzeichnis	195
9	Anhänge	217
9.1	Abkürzungsverzeichnis	217
9.2	Abbildungsverzeichnis	220
9.3	Tabellenverzeichnis	227
9.4	Lebenslauf	228
9.5	Publikationsliste	229
9.6	Erklärung zur wissenschaftlichen Arbeit	230
9.7	Danksagungen	231

1 Kurzdarstellung der Arbeit (Short Summary)

Präventive Effekte von konjugierten Linolsäureisomeren und verzweigtkettigen Fettsäuren: Die Rolle der nuklearen Rezeptoren PPAR in der Kolonkarzinogenese

Maren Leifheit – Dissertation Universität Hannover 2006

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung des präventiven Potentials von natürlich vorkommenden Fettsäuren zur Vorbeugung von Kolonkarzinomen. Fettreiche Ernährung ist mit einer erhöhten Inzidenz von Krebserkrankungen wie Kolon-, Brust- und Prostatakrebs verbunden. Experimentelle Studien weisen andererseits darauf hin, dass der Konsum bestimmter Fettsäuren, insbesondere der von ungesättigten Fettsäuren, zur Krebsprophylaxe beitragen kann. Die molekularen Mechanismen der möglichen protektiven Effekte sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisherige Studien zeigen, dass konjugierte Linolsäureisomere (CLAs), die zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren gehören, Kolontumore inhibieren können. In der vorliegenden Arbeit sollten daher zwei ausgewählte CLA-Isomere, 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA, auf ihren Effekt während der Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen analysiert werden. Hierbei wurde deutlich, dass das Minorisomer 10E,12Z-CLA (IC_{50} 3,1 μ M) eine deutlich stärkere halbmaximale Proliferationshemmung in Caco-2 Zellen bewirken konnte als das Hauptisomer 9Z,11E-CLA (IC_{50} 82,1 μ M).

Die Entstehung von Kolonkarzinomen ist häufig mit der Mutation des Tumorsuppressorgens *APC* und einer daraus resultierenden Erhöhung der β -Catenin Aktivität im Cytosol verbunden. Freies β -Catenin bildet einen Komplex mit dem T-Zellfaktor 4 (TCF-4), wird dann in den Zellkern transportiert und induziert dort Zielgenen wie *c-myc* und *cyclin D1*, die für eine erhöhte Zellproliferation verantwortlich sind. Eine Korrelation zwischen der Proliferationshemmung von Kolonkarzinomzelllinien und der Inhibierung der molekularen Targets *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* durch die beiden CLAs konnte in dieser Arbeit hergestellt werden. Promotorstudien zur Aktivität von *myc* und *AP-1* (Response Element für *c-jun*) bestätigten die Hemmung der *c-myc* und *c-jun* Genexpression. Weiterhin wurde das freie β -Catenin in Caco-2 und HT29 Zellen von den beiden CLAs zeit- und konzentrationsabhängig gehemmt.

Der komplexe Vorgang aus Initiation, Promotion und Progression bei der Entstehung eines Kolonkarzinoms ist durch irreversible Zellveränderungen aufgrund von DNA-Schäden gekennzeichnet. In der Promotionsphase wird die Zellproliferation gesteigert, während es beim Übergang in die Progressionsphase zum Verlust von Differenzierungsmerkmalen und zur Steigerung der Malignität kommt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden untersuchten CLA-Isomere auch auf die Differenzierung von Tumorzellen wirken konnten. Das Markerenzym der Differenzierung, die spezifische Intestinale Alkalische Phosphatase (IAP), wurde von den CLAs signifikant aktiviert. Die steigenden Induktionen der Promotorregionen der bekannten Differenzierungsmarker *IAP*, *SI*, *CEA* und *iFABP* unter Einfluss von konjugierten Linolsäureisomeren bestätigten die Ergebnisse des Enzymassays. Die untersuchten mehrfach ungesättigten Fettsäuren konnten in humanen Karzinomzellen die Differenzierung auslösen.

Fettsäuren können mit Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) interagieren. Alle drei identifizierten Isotypen, PPAR α , γ und $\delta(\beta)$, werden im Darm exprimiert und bilden durch Bindung an Peroxisomale Response Elements (PPREs) Heterodimere mit Retinoid X Rezeptoren (RXRs). Aufgrund dieser Tatsache konnte in der vorliegenden Arbeit in HEK293 Zellen gezeigt werden, dass auch die beiden CLA-Isomere Transaktivatoren von PPAR δ sind und den Rezeptor konzentrationsabhängig aktivieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die beiden CLA-Isomere den Retinoid X Rezeptor aktivieren. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass CLAs ihre Effekte über den PPAR-Signalweg oder über die Heterodimerbildung von RXR mit anderen Rezeptoren ausüben könnten.

Aus der Literatur ist bekannt, dass PPAR δ vom β -Catenin-TCF-4 Heterodimerkomplex induziert wird. In vivo konnte die subkutane Injektion von Krebszellen mit erhöhter transkriptioneller β -Catenin-TCF-4 Aktivität und *PPAR δ* Expression Tumore induzieren. PPAR δ -null Zellen lösten dabei keine Effekte aus. Die tumorpromovierende Rolle von PPAR δ sowie die mögliche regulatorische Funktion des Rezeptors bei der Proliferation sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden. Anhand von stabil generierten Caco-2 hPPAR δ Klonen, die den Rezeptor überexprimieren (+/+ Klon 3) oder reprimieren (DN Klon 7), konnte ein Zusammenhang von PPAR δ -Expression und Proliferation hergestellt werden. Für eine halbmaximale Wachstumshemmung von PPAR δ überexprimierenden Caco-2 Zellen mussten höhere 10E,12Z-CLA Konzentrationen (IC₅₀ 125,1 μ M) eingesetzt

werden als bei den Caco-2 Wildtyp-Zellen (IC_{50} 3,1 μ M). Auf molekularer Ebene korrelierte die durch das Minorisomer induzierte gemessenen Wachstumshemmung mit der Inhibition der Proliferationsgene (*c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun*) in Rezeptor-überexprimierenden Zellen.

Karzinomzellen zeichnen sich durch eine Hyperproliferation, Dedifferenzierung und Apoptoseinhibition aus. Da der Peroxisomale Proliferator-aktivierte Rezeptor delta in Tumorgewebe erhöht exprimiert ist, sollte in dieser Arbeit der Effekt des Rezeptors auf die Apoptose charakterisiert werden. Konjugierte Linolsäureisomere hemmten verstärkt die Proliferation in Caco-2 Wildtyp-Zellen. Nach der Hypothese sollten die CLAs in dieser Zelllinie die Apoptose stärker induzieren als in PPAR δ überexprimierenden Klon 3 Zellen. Visuell, durch Acridin Orange-Färbung dargestellt, kondensierte das Chromatin in Caco-2 Wildtyp-Zellen stärker als in Rezeptor +/+ Zellen. Diese morphologische Beobachtung korrelierte mit der gesteigerten Caspase-3 Enzymaktivität.

Zum Verständnis der molekularen Mechanismen von humanen Kolonkarzinomzellen sollten nicht transformierte HCT116 Zellen vergleichend untersucht werden. Wildtyp HCT116 Zellen exprimieren den Rezeptor PPAR δ homolog und können als natürliche hPPAR δ +/+ Zellen betrachtet werden. In HCT116 -/- Zellen wurde der Rezeptor homolog ausgeknockt [Park et al., 2001]. Beide CLAs inhibierten das Wachstum von HCT116 -/- Zellen im Konzentrationsbereich, der 60-70 % niedriger lagen als bei Wildtyp HCT116 Zellen. Auf molekularer Ebene wurden die Targetgene der Proliferation, *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun*, in unbehandelten HCT116 +/+ Zellen erhöht exprimiert. Daraus wurde geschlossen, dass sich die Einflüsse der CLAs auf die Proliferation nicht nur auf transformierte Kolonkrebszellen beschränken, sondern sich auch in nicht transformierten Zellen mit Wildtyp *APC* zeigen. Weiterhin unterstützt diese Tatsache auch die untersuchten physiologischen Effekte der CLAs von andere Arbeitsgruppen.

Die als Precursor der konjugierten Linolsäuren bekannte Trans-Vaccensäure (TVA) stellte sich als Aktivator des Peroxisomalen Proliferator-aktivierten Rezeptors delta heraus, aktivierte ihn aber deutlich geringer als die CLAs. Eine Wachstumshemmung von Kolonkarzinomzellen konnte im Löslichkeitsbereich der TVA bis 300 μ M nicht beobachtet werden. Differenzierungsmarker wie die IAP wurde nicht induziert. Die Aktivierung des *IAP*-Promotors durch TVA war im Vergleich zu den beiden CLA-Isomeren 50 % geringer. Das Wachstum von Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 Zellen

konnte durch 300 μM TVA überraschend um 225 % der Kontrolle gesteigert werden. Zusammenfassend deutet einiges darauf hin, dass die TVA keinen Einfluss auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen hatte und die Differenzierung von Caco-2 Zellen möglicherweise nur untergeordnet beeinflussen konnte. TVA war auf der anderen Seite ein PPAR δ Aktivator und erste Ergebnisse zeigen, dass diese Fettsäure die Proliferation in Rezeptor-überexprimierenden Caco-2 Zellen stimulieren könnte. Im Vergleich zu den Effekten im niedrigen Konzentrationsbereich der CLA sind die molekularen und zellulären Effekte auf die Kolonkrebszellen nicht durch den Precursor vermittelt worden, sondern offenbar von den CLAs selber.

Zur weiteren Analyse von möglichen strukturspezifischen Aktivitätsbeziehungen von Fettsäuren sollte die Phytansäure eingesetzt werden. Diese Substanz zählt zu den länger- und verzweigt-kettigen Fettsäuren und ist der sehr intensiv erforschten kurz- und verzweigt-kettigen Valproinsäure (VPA) strukturell ähnlich. Es wurde gezeigt, dass VPA antikanzerogene Eigenschaften hat, proliferationshemmend wirkt und die Differenzierung von Brust- und Kolonkrebszellen zu induzieren vermag. Außerdem ist VPA ein PPAR δ Aktivator. Nach der aufgestellten Arbeitshypothese könnte die Phytansäure ähnliche Effekte haben. Weiterhin wurde sie in der Literatur bereits als RXR- und PPAR α -Ligand beschrieben. Es stellte sich heraus, dass Phytansäure auch PPAR δ aktivieren konnte, die Affinität für PPAR α jedoch höher war. Auf zellulärer und molekularer Ebene konnte die verzweigt-kettige Fettsäure Einfluss auf das Wachstum von Kolonkarzinomzellen nehmen. Weiterhin korrelierte die Hemmung der Proliferationsgene mit der verminderten Aktivität der Promotorregionen von *myc* und *AP-1*. In Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 Zellen konnte keine signifikante Proliferationshemmung im untersuchten Konzentrationsbereich bis 300 μM beobachtet werden. Im Bezug auf die Differenzierungsinduktion von Caco-2 Kolonkarzinomzellen durch Phytansäure konnte keine klare Aussage getroffen werden. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die Phytansäure einen anderen molekularen Mechanismus haben könnte als die konjugierten Linolsäureisomere. Die eintretende Proliferationshemmung geht nicht eindeutig mit der Differenzierungsinduktion einher, wie es bei der 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA beobachtet werden konnte.

Schlagnworte: CLA, PPAR δ , Kolonkarzinogenese

Preventive effects of conjugated linoleic acids and branched chain fatty acids:

The role of the nuclear receptors PPAR in colon carcinogenesis.

Maren Leifheit – PhD Thesis University of Hanover 2006

The overall aim of this study was the investigation of the preventive action potential of naturally occurring fatty acids to prevent colon cancer. To date a diet with a high fat content is associated with an increased incidence of cancer diseases such as colon, breast and prostate gland cancers. In contrast, experimental studies also point out that the consumption of certain fatty acids, particularly nonsaturated fatty acids, can contribute to a cancer prophylaxis. The molecular mechanisms of both adverse and possible protective effects have not been clarified so far. Several studies have proposed that dietary conjugated linoleic acids (CLAs), a class of polyunsaturated fatty acids, are able to inhibit colon tumorigenesis. According to this hypothesis, two selected CLA isomers, 9Z,11E- and 10E,12Z-CLA, have been analyzed in regard to their effects on the proliferation of human colon carcinoma cells. This study could be clarified that the naturally occurring minor isomer 10,E-12Z-CLA (IC_{50} 3,1 μ M) could cause a much more effective half maximum proliferation inhibition of Caco-2 cells than the main isomer 9Z,11E-CLA (IC_{50} 82,1 μ M).

The formation of colon carcinomas is frequently connected with the mutation of the tumor suppressor gene *APC* and the resulting increase in β -Catenin activity in the cytosol. Herein free β -Catenin forms a complex with the T-cell factor 4 (TCF-4), gets shuttled to the nucleus and induces target genes like *c-myc* and *cyclin D1*, which are responsible for increased cell proliferation. There was a correlation between a decreased proliferation of colon carcinoma cell lines and the inhibition of the molecular targets *c-myc*, *cyclin D1* and *c-jun* measured in this study which supports the hypothesis, that CLAs could exert their effect by influencing the β -catenin-TCF4 pathway. Promoter studies of the activity of *c-myc* and *AP-1* (the response element for *c-jun*) confirmed the inhibition of *c-myc* and *c-jun* gene expression. Furthermore, the free β -Catenin was decreased by both CLAs time and concentration dependent. This effects could be demonstrated on both gene and protein level in both Caco-2 and HT29 cell lines.

The complex process of initiation, promotion and progression in the formation of colon cancer is indicated by for example irreversible cell changes due to DNA

damage. In the promotion phase the cell proliferation is increased while, in the progressions phase, it comes to the loss of differentiating characteristics and to the increase of malignity. Subsequently, it could be demonstrated in this study that both investigated CLA isomers might have an influence on the differentiation of tumor cells. One marker enzyme of differentiation, the specific intestinal alkaline phosphatase (IAP), was activated by the CLAs significantly. The increased enzyme activity was also confirmed by the increasing induction of the promotor regions of *IAP*, *SI*, *CEA* and *iFABP* under influence of conjugated linoleic acids. The investigated polyunsaturated fatty acids could release the differentiation in human Caco-2 colon carcinoma cells.

Furthermore, fatty acids are able to interact with peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). All three identified isoforms, PPAR α , γ and $\delta(\beta)$, are expressed in the intestine and form heterodimer with retinoid X receptors (RXRs) by binding to peroxisome proliferator response elements (PPREs). In light of this fact, it could be shown in the paper that both CLAs are selective transactivators of PPAR δ when investigated in HEK293 cells. They activate the receptor concentration dependent. Furthermore, both CLA isomers interact also with the retinoid X receptor. These results indicate that CLAs can exert their effects both via PPAR controlled signaling pathways as well as by influencing the heterodimer formation of RXR with other receptors.

As has been published earlier, PPAR δ was induced by β -Catenin-TCF-4 heterodimer. In vivo, the subcutaneous injection of cancer cells with increased transcriptional β -Catenin-TCF-4 activity and *PPAR δ* expression could induce tumors. Accordingly, PPAR δ zero cells did not promote cancer in this model. The tumor promotional role of PPAR δ as well as the possible regulatory function of the receptor during proliferation should therefore be studied under CLAs influence. First stable Caco-2 hPPAR δ clones with overexpression (+/+ clone 3) or repression (DN clone 7) of the receptor were generated, than the PPAR δ expression and its relevance towards proliferation was investigated in this model. For a half maximum growth inhibition of PPAR δ overexpressed Caco-2 cells significantly higher concentrations of 10E,12Z-CLA (IC_{50} 125,1 μ M) had to be used in comparison to Caco-2 wild type cells (IC_{50} 3,1 μ M). This growth inhibition induced by the minor isomer of the CLAs was paralleled by inhibition of proliferation genes (*c-myc*, *cyclin D1* and *c-jun*) in receptor overexpressed cells.

As stated above carcinoma cells are characterized by a hyperproliferation and dedifferentiation. But they are also characterized by an inhibition of apoptotic pathways. Because the peroxisome proliferator activated receptor delta is expressed increasingly in tumor tissue, the effect of the receptor on apoptosis had also be characterized in this study. Therefore the effect of CLAs regarding apoptosis induction was investigated in Caco-2 hPPAR δ DN clone 7 and wild type cells. According to the hypothesis in this cell lines CLAs induced apoptoses more strongly than in PPAR δ overexpressed clone 3 cells. This supposition was confirmed correspondently. Represented by acridine orange dye the visual condensation of the Caco-2 wild type cells chromatin was observed and was more enhanced than in receptor +/+ cells. This morphological observation correlated with an activated Caspase-3 enzyme.

In order to understand the molecular mechanisms of human colon carcinoma cells, non transformed HCT116 cells have also been investigated. Wild type HCT116 cells express the receptor PPAR δ homologous and can be considered as natural hPPAR δ +/+ cells. In HCT116 -/- cells the receptor is knocked out homologous [Park et al., 2001]. Both CLAs inhibited growth of HCT116 -/- cells at about 60-70 % lower concentrations compared to the wild type HCT116 cells. Accordingly at the molecular level, the target genes of proliferation (*c-myc*, *cyclin D1* and *c-jun*) were increasingly expressed in untreated HCT116 +/+ cells. Therefore it was concluded that the effects on proliferation of CLAs do not only occurs in transformed colon cancer cells because non transformed cells with wild type APC are also effected. This supports the well established physiological effects of CLAs reported by other groups before.

Trans vaccenic acid (TVA) is known as a precursor of conjugated linoleic acid. However, it also activated PPAR δ although but even lower than the CLAs themselves. A growth inhibition of colon cancer cells such as Caco-2 and HT29 cells was not observed up to the solubility limit of TVA (approx. 300 μ M). Differentiation markers such as the IAP were not induced. Compared to both CLA isomers, the activation of the IAP promotor by TVA was more than 50 % lower. Interestingly, the growth of Caco-2 hPPAR δ +/+ clone 3 cells could be initiated by 300 μ M TVA up to 225 % of the control which was in contrast to the inhibitory growth effect of both CLAs. In summary, TVA has no effects on the proliferation of colon cells and only minor effects on the differentiation. On the other hand, TVA was shown to be an activator of PPAR δ and first results indicate that this fatty acid could potentially

stimulate the proliferation in receptor overexpressing Caco-2 cells. But in comparison to the low concentration effects of the CLAs, the molecular and cellular effects on colon cancer cells are most likely not mediated by the precursor TVA but by the CLAs themselves.

In order to further analyse a possible structure specific activity of naturally occurring fatty acids phytanic acid was investigated. This substance belongs to the class of long and branched chain fatty acids and does show structural parallels to the very intensely investigated short and branched chain fatty acid valproic acid (VPA). VPA has anticancerogenic qualities by displaying functions such as proliferation inhibition and is able to induce the differentiation in breast and colon cancer. In addition, VPA is a PPAR δ activator. In light of the current hypothesis, phytanic acid could have similar effects. Furthermore, past literature indicates that phytanic acid is already coined as a RXR and PPAR α ligand. It was shown that phytanic acid could activate also PPAR δ nevertheless the specificity was higher for PPAR α . In this study, it could be demonstrated that on the cellular and molecular level the branched chain fatty acid did influence the growth of colon cancer cells. This was again accompanied by an inhibition of proliferation genes and correlated with the decreased activity of the promoters from *myc* and *AP-1*. In Caco-2 hPPAR δ +/+ clone 3 cells, no significant inhibition of proliferation by phytanic acid could be observed up to 300 μ M. The results regarding the differentiation induction of Caco-2 colon carcinoma cells by phytanic acid were inconsistent, in so far no closing statement could be given regarding the differentiation potential of phytanic acid. In summary, it can be suggested that phytanic acid exerts its effects by other molecular mechanism than conjugated linoleic acids. The induction of proliferation inhibition is most likely not accompanied by an induction of differentiation as was observed by 9Z,11E- and 10E,12Z-CLA.

Keywords: CLA, PPAR δ , colon carcinogenesis

2 Einleitung

2.1 Konjugierte Linolsäureisomere und verzweigtkettige Fettsäuren

In den westlichen Industrienationen gehören kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Krebs seit Jahren zu den häufigsten Krankheiten [Breslow et al., 1997]. Es ist bekannt, dass Risikofaktoren wie Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus und Arteriosklerose durch die Ernährung beeinflusst werden können. Beschrieben wurde auch, dass bei Krebserkrankungen eine ausgewogene Ernährung die Prävention und Therapie unterstützen könnte [Kroke et al., 1997]. Ein zunehmendes Interesse besteht nun an der Aufklärung von Nahrungsbestandteilen, die protektive physiologische Wirkungen besitzen und in Zukunft als Functional Food bezeichnet und eingesetzt werden können. Hierbei spielen die Fette in unserer Nahrung eine kontroverse Rolle. Verschiedene Studien weisen auf eine im Bezug auf das Kolonkarzinom positive Wirkung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids; PUFA) hin [Fernandez et al., 1999], während andere wiederum auch schädigende Wirkung von trans-Fettsäuren (TFA) aufzeigen [Fritsche et al., 1998a]. Ha et al. wiesen 1987 erstmals eine anticancerogene Wirkung von konjugierten Linolsäuren (conjugated linoleic acid; CLA) nach, was diese Gruppe der Fettsäuren für die Wissenschaft immer interessanter machte.

Konjugierte Linolsäuren sind positionelle und geometrische Isomere der Linolsäure, deren Doppelbindungen in konjugierter Form vorliegen. Meist liegen sie in Lebensmitteln als komplexes Gemisch von verschiedenen cis- oder trans-Stellungsisomeren vor. Das Hauptisomer der natürlich vorkommenden CLA ist die 9Z,11E-Octadecadiensäure [Ip et al., 1994]. Alle anderen Isomere stellen nur Minorbestandteile dar. Abbildung 2-1 zeigt die Strukturformeln einiger Linolsäureisomere. Das biologisch besonders aktive Minorisomer ist die 10E,12Z-CLA.

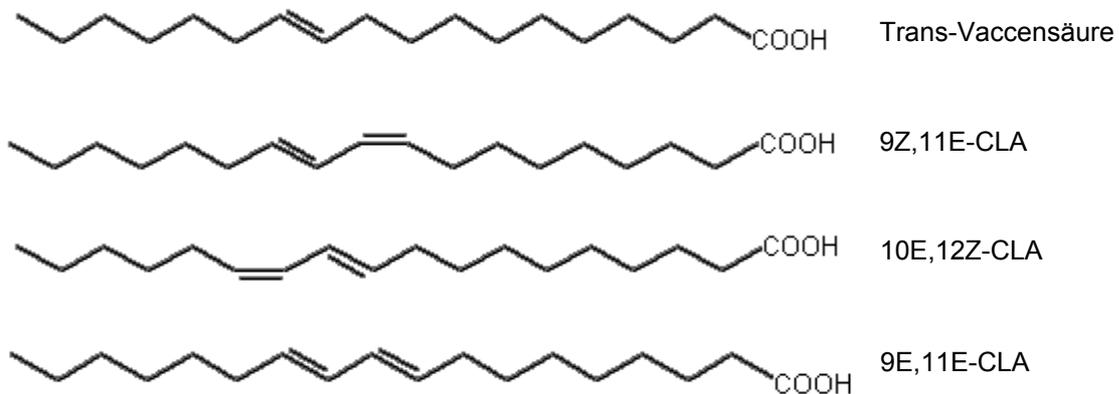


Abbildung 2-1: Strukturformeln der Trans-Vaccensäure und einiger Linolsäureisomere.

2.2 Herkunft und Bildung der CLAs

Für den menschlichen Körper stellt die Aufnahme von Nahrungsmitteln, die konjugierte Linolsäuren enthalten, die Haupt-CLA-Quelle dar. Konjugierte Linolsäuren und trans-Fettsäuren werden im Pansen von Wiederkäuern gebildet. Die höchsten CLA-Gehalte sind deswegen hauptsächlich in Milch, Milchprodukten, Fleisch und Fleischprodukten von Wiederkäuern zu finden. Ein gesunder Mensch im Nordwesten der USA nimmt ~150 mg/Tag (Frauen) bis ~200 mg/Tag (Männer) CLAs mit der täglichen Nahrung auf [Ritzenthaler et al., 2001]. Eine andere Studie von Fritsche und Steinhart [1998b] schätzt die tägliche Aufnahme von CLAs mit 430 mg/Tag bei Männern und 350 mg/Tag bei Frauen sogar noch höher ein. Das Hauptisomer 9Z,11E-CLA kann in tierischen Lebensmitteln 80-90 % des gesamten CLA-Gemisches erreichen. Im Blut von Nicht-Vegetariern konnte ein Gesamt-CLA-Gehalt von 20–70 μM nachgewiesen werden, wobei ~80 % davon das 9Z,11E Isomer darstellten [Fogerty et al., 1988]. Darüber hinaus wird das Hauptisomer auch durch die $\Delta 9$ -Desaturierung von Trans-Vaccensäure (TVA) gebildet [Santora et al., 2000]. Trans-Vaccensäure wird ebenfalls vom Menschen mit der täglichen Nahrung aufgenommen, allerdings in größeren Mengen als die CLAs selber [Santora et al., 2000]. Die Bildung der anderen CLA-Minorisomere beruht auf einer Reihe verschiedener Isomerasen, die substratspezifisch für die jeweiligen Doppelbindungssysteme sind [Griinari et al., 1999].

2.3 Physiologische Bedeutung und Stoffwechselweg

Cook et al. beschrieben 1993 positive Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf das Immunsystem, während ein Jahr später zum ersten Mal auch antiatherogene Effekte gezeigt werden konnten [Lee et al., 1994]. 1996 konnten von Pariza et al. Einflüsse der CLAs auf den Körperfettanteil und die Proteinmasse festgestellt werden. Im darauffolgenden Jahr wurde eine Steigerung in der Knochenmasse beobachtet [Seifert et al., 1997]. In einer Tierstudie zeigten Houseknecht et al. 1998 eine Normalisierung der Glukosetoleranz bei mit CLAs gefütterten Ratten. Auf einen möglichen antithrombotischen Effekt wurde 1999 geschlossen, als sich die konjugierten Linolsäuren als Antagonisten einer Plättchenaggregation erwiesen [Truitt et al., 1999]. In der folgenden Abbildung 2-2 sind alle bisher nachgewiesenen physiologischen Effekte der CLAs zusammenfassend aufgeführt.

CLAs	<ul style="list-style-type: none"> 1) anticancerogen 2) antidiabetogen 3) immunmodulierend 4) antithrombotisch 5) antiatherogen 6) positiv anabol
-------------	---

Abbildung 2-2: Physiologische Effekte von konjugierten Linolsäuren.

In Rattenstudien konnte gezeigt werden, dass durch CLA-Fütterung ein Rückgang des Arachidonsäuregehaltes im Gewebe stattfand [Banni et al., 1999]. Arachidonsäure ist die Ausgangssubstanz für die Eicosanoidbiosynthese [Smith et al., 1991]. Konjugierte Linolsäuren beeinflussen die Eicosanoidbiosynthese, was eine Erklärung für die antikarzinogene Wirkung, die immunmodulierende Funktion [Chew et al., 1997] und die antiatherogene Aktivität [Lee et al., 1994] der CLAs sein könnte. Weiterhin könnte auch die antidiabetogene Eigenschaft der CLAs auf die bei dieser Synthese entstehenden Eicosanoide zurückzuführen sein, da diese vielfältige biologische Wirkung in den genannten Bereichen aufweisen [Eisenbrand et al., 1995].

2.4 Verzweigt-kettige Fettsäuren

Phytansäure ist eine verzweigt-kettige Fettsäure, die im Rumen von Wiederkäuern entsteht. Das ubiquitär vorkommende Chlorophyllmolekül enthält Phytol, welches eine Vorläufersubstanz von Phytansäure in Säugetieren darstellt. Phytol wird bakteriell gespalten und zu Phytensäure oxidiert (Abbildung 2-3). In vivo konnte gezeigt werden, dass sich dieser Metabolit nach Verabreichung von Phytol im Organismus akkumuliert [Steinberg et al., 1966]. In vitro-Studien mit postnukleären Fraktionen aus Rattenleber haben gezeigt, dass die Konversion von Phytol zu Phytansäure in mitochondrialen und mikrosomalen Fraktionen stattfindet [Muralidharan et al., 1985].

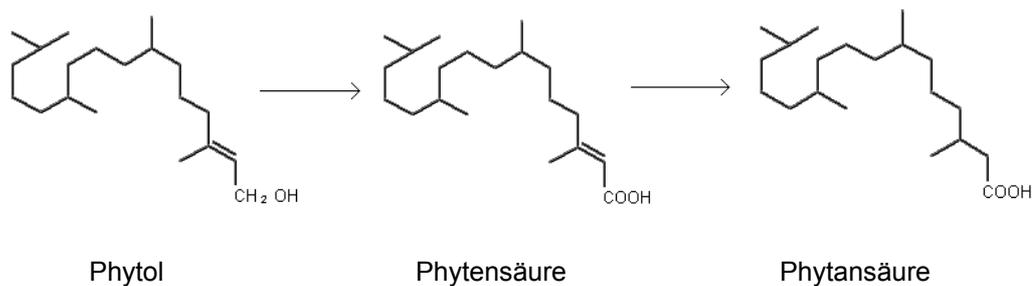


Abbildung 2-3: Biosyntheseweg von Phytansäure.

Phytansäure wird außerdem im Fettgewebe von Wiederkäuern angereichert und kann durch den Verzehr von tierischem Schmalz und Milchprodukten aufgenommen werden. Pro Tag nimmt ein Mensch durchschnittlich 50-100 mg Phytansäure auf [Steinberg, 1965].

Phytansäure ist wegen ihrer Methylgruppe in β -Stellung für eine übliche β -Oxidation nicht zugänglich. Sie muss daher in einer zweistufigen α -Oxidation zur Pristansäure umgewandelt werden, bevor ein Fettsäureabbau durch β -Oxidation stattfinden kann. Abbildung 2-4 zeigt eine schematische Darstellung des Phytansäureabbaus.

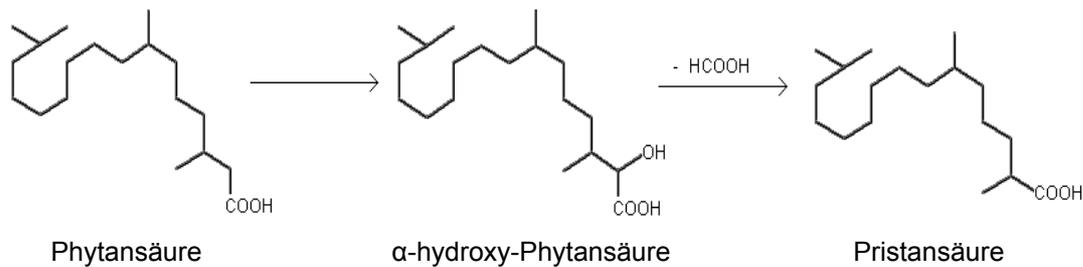


Abbildung 2-4: Phytansäureabbau durch α -Oxidation.

Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass die Phytansäure- α -Oxidation in den Peroxisomen erfolgt [Singh et al., 1993; Wanders et al., 1994; Jansen et al., 1996]. Phytansäure wurde im menschlichen Blut in μM -Konzentrationen gefunden [Kitareewan et al., 1996], bei denen auch *in vitro* eine Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors α (PPAR α) nachgewiesen werden konnte. Es wurde sowohl eine Funktion der Phytansäure als Ligand des Retinoid Rezeptors RXR α [LeMotte et al., 1996] als auch der des PPAR α [Ellinghaus et al., 1999] beschrieben, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass Phytansäure eine wichtige biologische Funktion ausübt. Weiterhin wurde Phytansäure als Regulator des Lipidstoffwechsels identifiziert und zur Prophylaxe von Herz-Kreislaufkrankungen und Diabetes vorgeschlagen.

2.5 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)

Peroxisomen sind ubiquitär vorkommende Zellorganellen in eukaryotischen Zellen. Sie sind von einer einfachen Membran umgeben und variieren in ihrer Größe, Gestalt, Häufigkeit und enzymatischen Ausstattung in den jeweiligen Spezies und Zelltypen [Hruban et al., 1969]. Der Name „Peroxisom“ wurde von De Duve aufgrund der Bedeutung dieser Organelle für den Wasserstoffperoxid-Metabolismus geprägt [De Duve et al., 1966]. Inzwischen sind über 50 verschiedene peroxisomale Enzyme bei Säugetieren nachgewiesen worden, von denen die Mehrzahl am Lipidstoffwechsel beteiligt ist [Übersicht über peroxisomale Stoffwechselwege siehe Baumgart 1998]. Einige metabolische Reaktionen sind z.B. die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren [Lazarow et al., 1976], die α -Oxidation von Phytansäure [Poulos et al., 1993] und der Metabolismus von Aminosäuren [Masters, 1997]. Fettreiche Ernährung und Peroxisomen-Proliferatoren induzieren die Peroxisomen-Proliferation bei Nagetieren [Hawkins et al., 1987]. Diese Proliferation ist eine pleiotrope Antwort der Zelle, die zu Änderungen in der Morphologie, Anzahl und Enzymaktivität von Peroxisomen führt [Lock et al., 1989]. Die zentrale Schaltstelle der Peroxisomen-Proliferation, der Transkriptionsfaktor PPAR (Peroxisomen Proliferator-aktiver Rezeptor), wurde 1990 von Issemann und Green gefunden. Der molekulare Mechanismus der PPARs ist dem der Steroidhormonrezeptoren ähnlich. Endogene Liganden, wie Eicosanoide, gesättigte, sowie einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren [Corton et al., 2000] und exogene Liganden können die PPAR-Isotypen unterschiedlich stark aktivieren. Drei dieser Isotypen konnten identifiziert werden: α , β (auch δ genannt) und γ . PPAR α reguliert den Abbau von Fettsäuren und wird hauptsächlich in der Leber, in der Niere, in braunem Fettgewebe, im Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Die Zielgene von α sind am Lipidkatabolismus beteiligt und regulieren die Fettsäureaufnahme über Membranen, Fettsäurebindung in Zellen, Oxidation in Mikrosomen, Peroxisomen und Mitochondrien und den Lipoproteintransport. PPAR γ beeinflusst die Lagerung von Fettsäuren im Gewebe und ist an der Reifung von Präadipozyten zu Fettzellen beteiligt [Rosen et al., 1999]. Die überwiegenden Zielgene von γ sind an lipogenen Stoffwechselwegen beteiligt. Hierzu zählen die Lipoprotein-Lipase, das Adipocyt-Fettsäure-bindende Protein, die Acyl-CoA-Synthase und das Fettsäure-Transportprotein. Über den Rezeptor PPAR δ ist weniger bekannt. Er wird als

ubiquitär exprimierend bezeichnet, und eine Rolle in der Kolonkarzinogenese wird diskutiert. Konkrete Zielgene für die δ -Isoform sind weitestgehend unbekannt. Bekannt ist, dass PPAR δ im APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweg eine wichtige Rolle spielt [He et al., 1999]. Eine Überexpression des cytosolischen β -Catenins aufgrund einer APC-Mutation im Tumorsuppressorgen führt zu einer Induktion von PPAR δ und somit zu einer verstärkten Expression der Proliferationsgene *c-myc* und *cyclin D1* [He et al., 1998], was zur späteren Karzinombildung führen kann (siehe Abschnitt 2.9, Kolonkarzinogenese). PPAR δ ist in der Blastozystenimplantation involviert [Lim et al., 1999] und im „umgekehrten“ Cholesteroltransport [Oliver et al., 2001]. Möglicherweise ist PPAR δ auch an der Entstehung von Neuralrohrdefekten im Embryo während der Organogenese beteiligt [Lampen et al., 1999; Wehring et al., 2001]. Eine weitere Aufgabe scheint PPAR δ im Fettsäuremetabolismus zu übernehmen. Vosper et al. konnten 2001 zeigen, dass PPAR δ die Aufnahme und Speicherung von Fettsäuren in humanen Makrophagen durch erhöhte Expression von CD36 (class B scavenger receptor) und A-FABP (adipose-type fatty acid-binding protein) unterstützt. Mit Hilfe des Rezeptors PPAR δ könnte in Zukunft die Möglichkeit bestehen, in unkontrollierte Steuerungsvorgänge transformierter Zellen einzugreifen und diese zu inhibieren.

2.6 Struktur eines Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors

Obwohl die Gruppe der PPARs in drei unterschiedliche Isoformen unterteilt werden konnte, gleichen sie in ihrem Aufbau einem Schema. Jeder Rezeptor ist in 4 Abschnitte gegliedert. Eine Unterteilung in Liganden-bindende, aktivierende und DNA-bindende Domäne ist identisch. Die aminoterminalen Region A/B steht für eine Liganden-unabhängige transkriptions-aktivierende Domäne. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass ihr phosphorylierter Zustand bei den Isoformen α und γ die Affinität der Rezeptoren steuert und somit die Transkription der entsprechenden Zielgene wie PBP und TR β beeinflussen kann [Shalev et al., 1996; Zhu et al., 1997; Diradourian et al., 2005; Moore et al., 2005]. Die Liganden-bindende Region E/F befindet sich am gegenüberliegenden C-terminalen Ende des Rezeptors und wandelt ihn bei Aktivierung in eine aktive Form um. In diesem Zustand kann sich der Rezeptor an die DNA ihrer Zielgene binden und die Expression steuern. An dieser Stelle ist es Co-Aktivatoren möglich, eine aktivierende oder auch inhibierende Funktion auszuüben. Ein Beispiel für derartige Co-Aktivatoren ist das CREB-binding protein CBP/P300 [Dowell et al., 1997]. Die C-Region des Rezeptors ist die eigentliche DNA-bindende Domäne. Sie lagert sich nach Induktion des Rezeptors mit hoher Spezifität an die PPREs (peroxisomen proliferator response element) an und leitet so die Expression verschiedener Zielgene ein. [Übersicht PPAR Targetgene siehe Tachibana et al., 2005] Als eine notwendige flexible Region des Rezeptors wurde die D-Domäne identifiziert. Sie ermöglicht der DBD (DNA-binding domain) eine räumliche Bewegungsfreiheit gegenüber der LBD (Ligand-binding domain). In Abbildung 2-5 ist der schematische Aufbau eines Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors dargestellt.

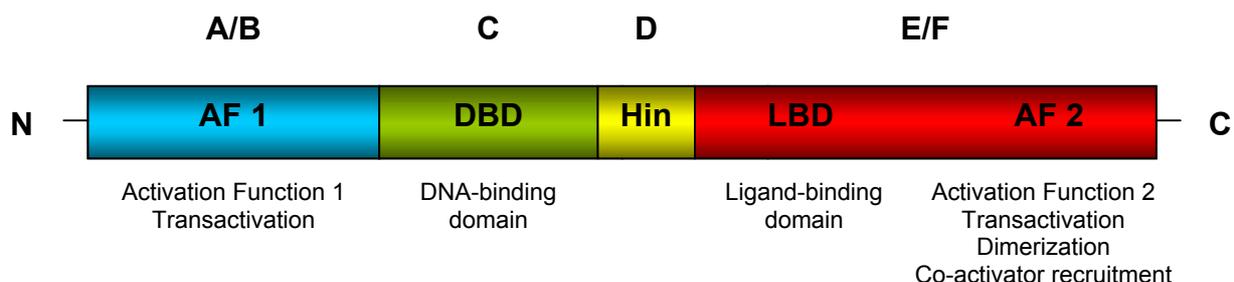


Abbildung 2-5: Schematische Struktur eines Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors.

2.7 Histondeacetylase-Inhibitoren in der Krebstherapie

Die Anordnung der DNA um oktamere Proteinkomplexe im Zellkern (Kernhistone) wird als Proteosom bezeichnet. Das Chromatin ist die Summe aller Proteosomen. Die Fähigkeit der Zelle zur Genexpression ist an die Dichte des Chromatins gekoppelt. Die Modulation der Chromatin-Struktur ist ein elementarer Mechanismus der Genregulation. Eine damit verbundene Modifikation der Kernhistone durch Acetylierung und Deacetylierung wird von Proteinen der Histondeacetylasen (HDACs) und Histonacetylasen (HATs) durchgeführt. Diese Reaktionen sind spezifisch und können die Transkription und Expression einzelner Gene gezielt induzieren oder reprimieren. HDACs und HATs sind zusammen mit Transkriptionsfaktoren in Proteinkomplexen aktiv [Alberts et al., 2002]. Eine abweichende Acetylierungs- und Deacetylierungsdichte der Kernhistone ist u.a. mit diversen Tumorerkrankungen assoziiert [Überblick Dissertation Daniel Eikel, 2005]. Durch Histondeacetylase-Inhibitoren kann eine klinische Behandlung der Erkrankungen erfolgen und eine Regression durch eine pharmakologische Differenzierungstherapie bei malignen Tumoren erreicht werden [Kim et al., 2001; Kramer et al., 2001].

Histondeacetylasen sind an der Proliferation und Differenzierung der Zelle und dem Zellzyklus beteiligt. Als direktes Target dieser Enzymklasse der HDACs wurde die Valproinsäure (VPA) beschrieben [Phiel et al., 2001; Göttlicher et al., 2001]. Diese verzweigtkettige Fettsäure ist eine Substanz mit breitem Wirkungsspektrum. Sie wird nicht nur als Chemotherapeutikum zur Behandlung von Tumorerkrankungen erforscht, sondern wird bereits als Antiepileptikum (EU Zulassung 1967) sowie bei der Behandlung von Migräneanfällen [Sorensen, 1988] und bipolaren Erkrankungen wie Depressionen und Psychosen [Bowden et al., 1994] eingesetzt. Im Zellsystem wirkte VPA antiproliferativ auf z.B. neuronale Zellen [Martin und Regan, 1991; Bacon et al., 2002]. Ein Zusammenhang der proliferationsinhibierenden Eigenschaften verschiedener VPA-Derivate und deren teratogener Effekte wurde 1997 von Courage-Maguire et al. hergestellt. Trotz Anwendung von VPA in der Krebstherapie [Kultima et al., 2004] sind direkte Zielgene und molekulare Signalkaskaden weitestgehend unbekannt. Teratogene VPA-Derivate lösten in CHO und F9 Zellen eine Differenzierung aus und aktivierten selektiv den Peroxisomen Proliferator-

aktivierten Rezeptor delta (PPAR δ) [Lampen et al., 1999]. Eine direkte Interaktion von VPA und PPAR δ konnte jedoch nicht gezeigt werden [Lampen et al., 2001; Lagace et al., 2004], so dass vermutet wurde, dass der Rezeptor möglicherweise erst im Verlauf der durch VPA ausgelösten Signalkaskade aktiviert wird. 2001 konnten Göttlicher et al. einen Zusammenhang zwischen der Teratogenität von VPA-Derivaten und HDAC-Inhibition demonstrieren. Aufgrund der bisherigen Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Valproinsäure [Übersicht VPA bei Blaheta et al., 2002] könnten möglicherweise auch andere PPAR δ -Aktivatoren HDAC-Inhibitoren sein und zur Behandlung und Prävention bei Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Weiterhin ist VPA für die Grundlagenforschung diverser molekularbiologischer Mechanismen eine gut charakterisierte Positivkontrolle.

2.8 Retinoid Rezeptoren

Retinoid-Rezeptoren sind nukleäre Transkriptionsfaktoren, die in zwei Familien unterteilt wurden: die Retinsäure-Rezeptoren (RAR, Retinoic Acid Receptors) und die Retinoid-Rezeptoren (RXR, Retinoid X Receptors). Beide sind Mitglieder einer Superfamilie, zu der auch der Thyroidhormon-Rezeptor (THR), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) und der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) sowie einige Rezeptoren mit unidentifizierten Liganden (orphan receptors) zählen. Die Rezeptoren haben eine Masse von 55 kDa und können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in unterschiedliche Regionen unterteilt werden. Alle Domänen zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmungen unter den Mitgliedern einer Familie, während keine wesentlichen Homologien zwischen RAR und RXR festgestellt werden konnten [Levin et al., 1992]. Retinoid-Rezeptoren wirken als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, wie die PPARs. Sie binden ebenfalls durch bestimmte DNA-Sequenzen (Response-Elemente) an Promotorregionen von Zielgenen. All-trans-Retinsäure (at-RA) ist ein hochaffiner Ligand für RAR, aber nicht für RXR. 9-cis-Retinsäure bindet hingegen an beide Rezeptor-Familien [Heyman et al., 1992]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Phytansäure als RXR-Ligand fungiert, RAR aber nicht aktiviert [LeMotte et al., 1996]. Beide Rezeptoren, RAR und RXR, können auch Heterodimere miteinander bilden. Hierbei wurde herausgefunden, dass der RXR bei der Signaltransduktion als Master-Regulator fungiert, da er auch Heterodimerpartner für andere Rezeptoren (VDR, THR) sein kann. Zu ihnen zählen auch die Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs). Der RXR kann auf der einen Seite bei Abwesenheit eines Liganden als stiller Partner fungieren, auf der anderen Seite mit gebundenem Liganden als aktiver Heterodimerpartner zur Signaltransduktion beitragen und diese verstärken. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass teratogene Effekte in der Maus durch gleichzeitige Gabe von RAR- und RXR-Liganden potenziert werden konnten [Elmazar et al., 1997]. Lampen et al. beschrieben 2001 einen additiven Effekt des all-trans-Retinsäure (at-RA) Metabolismus und synergetische Effekte auf die CYP26 Genexpression in Zellkulturen, die mit einem RAR-Liganden und einem RXR-Liganden behandelt wurden. Interessant ist in vitro herauszufinden, ob eine Potenzierung zellulärer Effekte ebenfalls erreicht werden kann, wenn PPAR-Aktivatoren und spezifische RXR-Liganden, wie CD2608 (RXR α) und CD3159 (RXR α , β und γ) [Koch et al., 1996], gemeinsam wirken.

2.9 Kolonkarzinogenese

Bekannt ist, dass das kolorektale Karzinom eine der häufigsten Erkrankungen in den westlichen Industrieländern ist. In Deutschland sind ca. $\frac{1}{3}$ aller jährlichen neuen Krebserkrankungen maligne Tumore des Gastrointestinaltraktes. Etwa die Hälfte sind Karzinome des Kolons und des Rektums. Weiterhin sind diese Krebsarten, zusammengefasst als kolorektales Karzinom, die zweithäufigste Todesursache bei beiden Geschlechtern. 90-95 % dieser Karzinome treten sporadisch auf, während bei 5-10 % eine familiäre genetische Prädisposition vorliegt. Eine der genetischen Tumorerkrankungen ist die familiäre adenomatöse Polyposis [Lynch et al., 1998; Bodmer, 1999; Burt, 1999].

Die Entstehung eines Kolonkarzinoms ist ein komplexer Vorgang aus Initiation, Promotion und Progression. In der Initiationsphase kommt es zu einer irreversiblen Veränderung von Zellen aufgrund von DNA-Schäden. Im Anschluss daran erfolgt die Promotionsphase, in der die Zelle ihre Zykluskontrolle verliert und die Zellproliferation steigert. Beim Übergang in die Progressionsphase kommt es zum Verlust von Differenzierungsmerkmalen und zur Steigerung der Malignität. In allen Prozessen sind hauptsächlich zwei Klassen von proliferationsmodulierenden Genen beteiligt. Zum einen Proto-Oncogene, wie *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun*, die durch Mutationen wachstumsfördernde Funktionen erlangen und zum anderen Tumorsuppressorgene, wie *apc*, die ihre wachstumskontrollierende Funktion durch Mutation verlieren [Oving und Clevers, 2002; Review Molekulare Grundlagen von Kolonkrebs]. Während der Kolonkarzinogenese werden Proto-Oncogene aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert. 1996 konnten Peifer et al. zeigen, dass das Protein β -Catenin eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Kolonkrebs spielt. Es stellte sich heraus, dass die intrazelluläre Konzentration des β -Catenins in Darmepithelzellen von Patienten, die an der familiären adenomatösen Polyposis (APC) des Dickdarms leiden, stark erhöht ist [Morin et al., 1997]. Diese Erkrankung wird durch Mutation des *apc*-Gens (Tumorsuppressorgen) hervorgerufen und stellt eine Prädisposition zum Dickdarmkrebs dar. In den meisten Fällen steht diese Genmutation im kausalen Zusammenhang mit der Tumorerkrankung [Kinzler et al., 1996]. Normalerweise bindet das APC-Wildtyp-Protein an β -Catenin und Axin. In diesem Komplex vorliegend wird das β -Catenin durch die Glycogen-Synthase-Kinase 3β (GSK- 3β)

phosphoryliert und nach Ubiquitinierung proteosomal degradiert [Aberle et al., 1997]. Bei Darmepithelzellen mit mutiertem APC ist der β -Catenin-Abbau nicht möglich, und es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären β -Catenin-Konzentration. Bekannt ist, dass β -Catenin für die Verknüpfung der Adhäsionsmoleküle der Cadherinklasse mit den Actinfilamenten des Cytoskeletts verantwortlich ist und somit die Zell-Zell-Adhäsion steuert. Weiterhin ist β -Catenin nach Translokation in den Zellkern in der Lage, die Expression spezifischer Gene für die Zellteilung und Proliferation zu forcieren. 1996 wurde entdeckt, dass β -Catenin nach Komplexbildung mit DNA-bindenden Proteinen aus der T-cell-factor (TCF)/Lymphoid-enhancer-binding factor (LEF)-Familie als Transkriptionsaktivator fungiert [Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996]. Diese Komplexbildung und die Tatsache, dass das APC-Protein für den niedrigen intrazellulären β -Catenin-Gehalt verantwortlich ist, zeigte die Bedeutung des APC-Proteins als negativer Regulator der Wnt-Signaltransduktionskaskade [Peifer, 1999]. Wird diese Kaskade übermäßig aktiviert, kommt es zur Krebsentstehung beim Menschen.

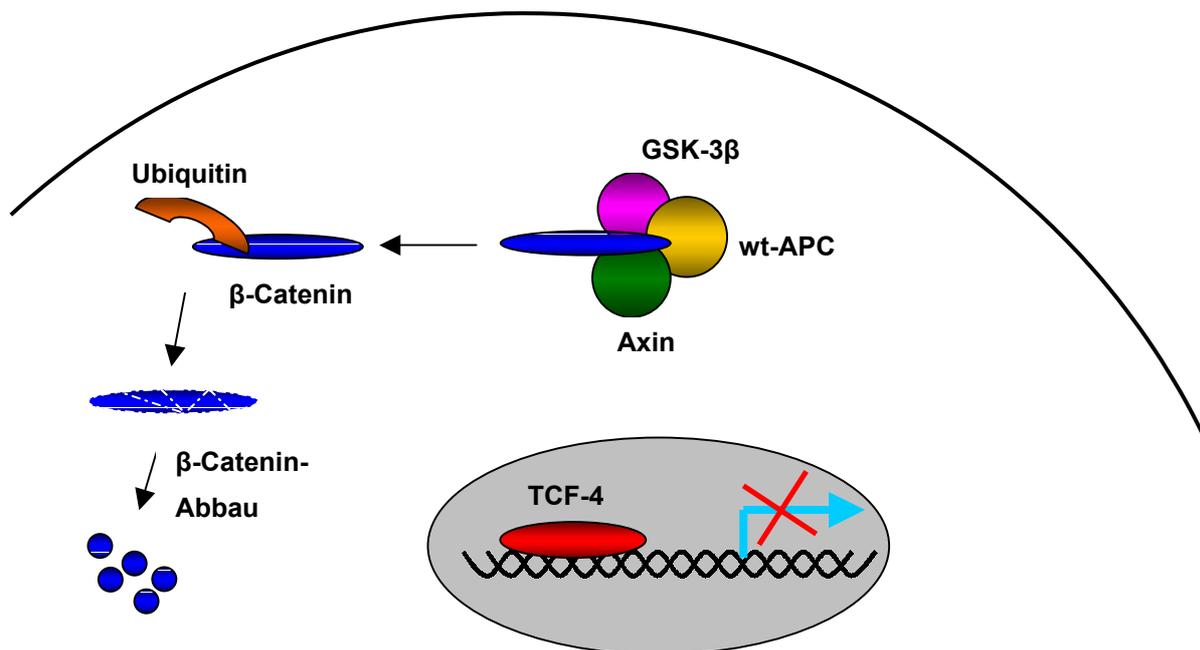


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges im normalen Darmepithel. Die Wirkung des β -Catenins wird durch dessen Abbau in den Proteasomen beendet.

Als Target-Gene dieser Signalkaskade wurden *c-myc* und *cyclin D1* identifiziert [He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu et al., 1999]. *c-myc* ist im

Kolonkarzinom überexprimiert [Smith et al., 1993]. Es wird durch Wildtyp-APC unterdrückt und durch die Formation des β -Catenin/TCF-4-Komplexes aktiviert. Dieses Protooncogen spielt eine Rolle beim Zellwachstum und bei der Zellzyklus-Progression. Eine Überexpression dieses Gens fördert die Transformation, inaktiviert normale Zellzyklusprozesse und stoppt die Induktion der Apoptose [Breckenridge et al., 2000]. *Cyclin D1*, ein Regulatorprotein bei der Progression des Zellzyklus, ist bei einem großen Teil von Dickdarm-Karzinomen überexprimiert [Bartkova et al., 1994; Arber et al., 1996]. Eine Inhibition der *cyclin D1*- Expression in Kolonkarzinom-Zelllinien führt zu einer Hemmung des Zellwachstums [Arber et al., 1997]. Transfektionen von Karzinom-Zelllinien mit dem *wt-apc*-Gen führten zum Abbau des β -Catenins und somit zur Verringerung der Konzentration an freiem β -Catenin im Cytosol. Eine derartige Reduktion des β -Catenin/TCF-Komplexes führte weiterhin zu einer Reduktion der *cyclin D1*-Expression und somit zu einem verminderten Zellwachstum. β -Catenin ist demnach ein Oncoprotein. Das APC-Protein ist ein wichtiger physiologischer Antagonist des β -Catenins und damit auch des Wnt-Signaltransduktionsweges. Weitere Protooncogene, wie *c-jun* und *fra-1*, besitzen TCF-Erkennungssequenzen in ihrem Promotor und werden durch β -Catenin reguliert. Die Expression dieser Gene wird durch *wt-apc* herunterreguliert [Zhang et al., 2001].

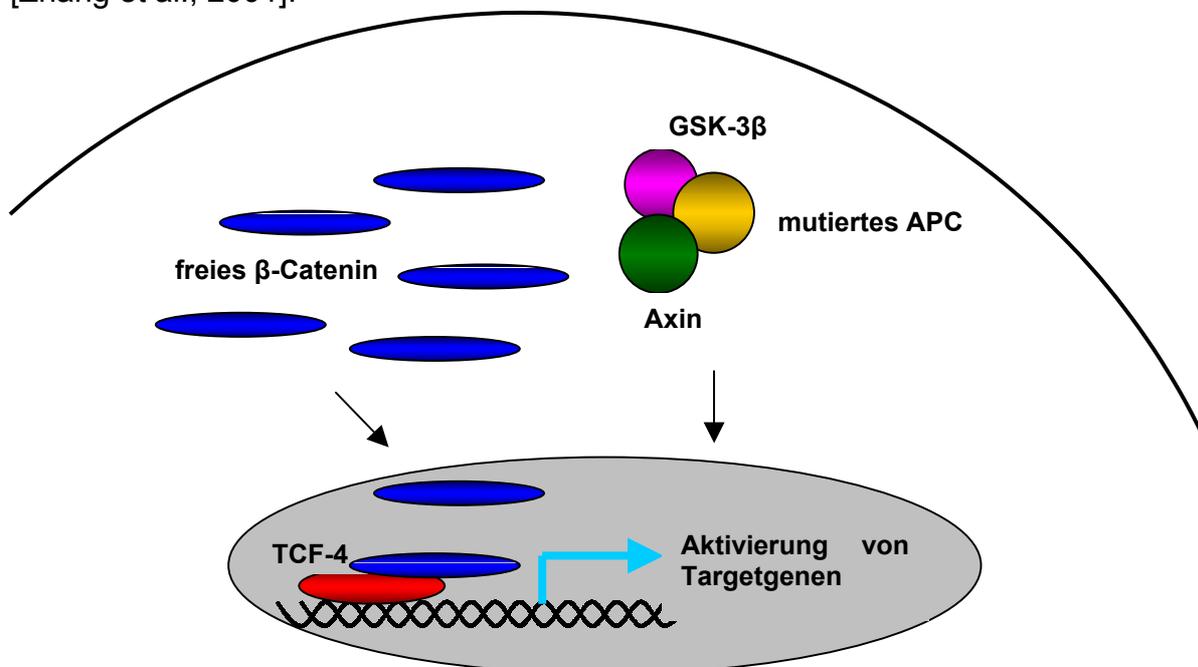


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der Signalkaskade in Kolonkarzinomzellen mit einem mutierten APC-Protein.

2.10 PPAR δ und seine Rolle in der Kolonkarzinogenese

Ein weiteres Targetgen des β -Catenin/TCF-Komplexes ist *PPAR δ* [He et al., 1999]. Dieser Liganden-abhängige Rezeptor reguliert die Expression von Zielgenen durch Bindung an DNA-Erkennungssequenzen. Liganden und Aktivatoren können mehrfach ungesättigte Fettsäuren sein, aber auch nichtsteroidale antiinflammatorische Wirkstoffe (NSAIDs). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die regelmäßige Einnahme von NSAIDs das Risiko, an Kolorektalkrebs zu erkranken, senkt [Siezen et al., 2006]. Beispiele für NSAIDs sind Sulindac, Indomethacin oder Aspirin. Sie blockieren Cyclooxygenasen (COX) und dadurch die Bildung der Prostaglandine, welche normalerweise die Entstehung von Dickdarmkrebs begünstigen. Prostaglandine fungieren als PPAR δ -Aktivatoren. Targetgen in diesem Zusammenhang ist die Cyclooxygenase 2. Weiterhin können NSAIDs PPAR δ direkt inhibieren und verhindern dadurch seine Bindung an die entsprechenden DNA-Erkennungssequenzen. Die β -Catenin-vermittelte Erhöhung der PPAR δ -Aktivität kann so unterdrückt werden [Chang et al., 2005].

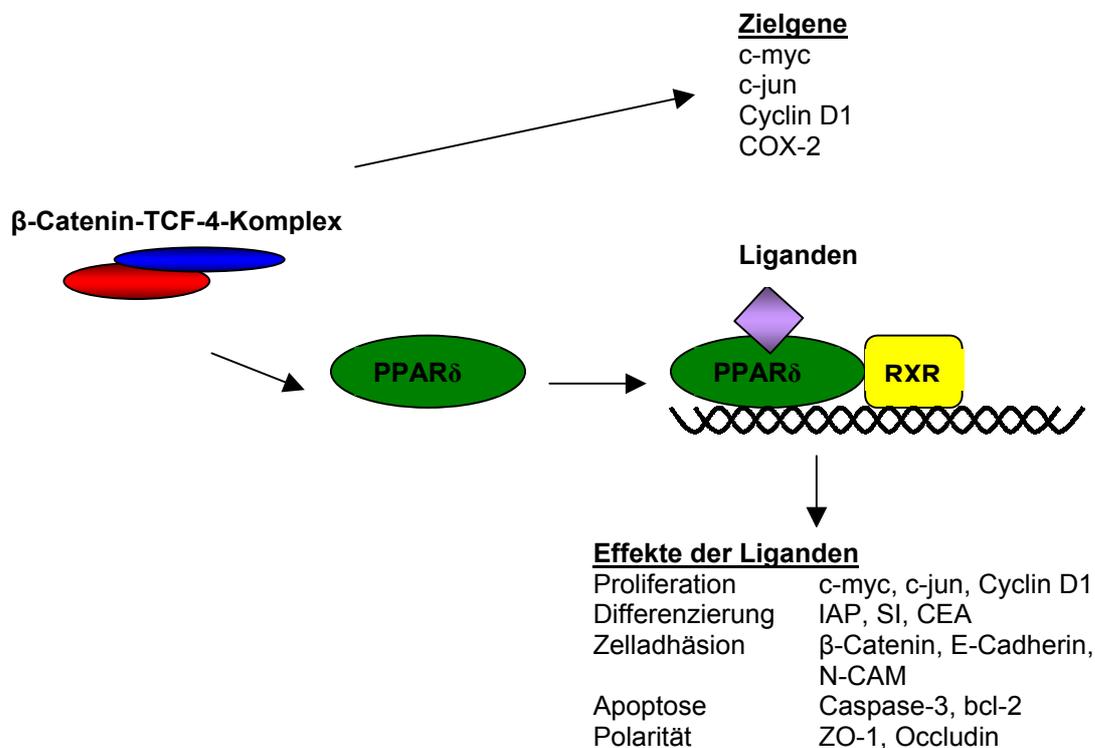


Abbildung 2-8: Hypothese der möglichen Rolle von PPAR δ während der Kolonkarzinogenese.

Beide Effekte können die PPAR δ -vermittelten Signalwege inhibieren und die Induktion von Kolonkrebs vermindern. Entsprechend wirkt auch das Wildtyp-APC-Protein über die Stimulation des β -Catenin-Abbaus als ein Antagonist der PPAR δ -Expression. Untersuchungen an Krebszellen zeigten, dass PPAR δ durch die Expression von APC vermindert wird, während die Überexpression von β -Catenin den gegenteiligen Effekt bewirkt. Es stellte sich heraus, dass während der proliferierenden Phase einer Caco-2 Zellkultur der β -Catenin-TCF-4-Spiegel erhöht ist. Sobald die Zellen ihre Konfluenz erreichen und in die Differenzierung übergehen, vermindert sich diese Aktivität, wobei Apoptose nicht zu detektieren ist [Mariadason et al., 2001]. Park et al. injizierten Nacktmäusen subkutan HCT116 Krebszellen, die eine erhöhte β -Catenin-TCF-4 transkriptionelle Aktivität und PPAR δ -Expression besaßen und induzierten damit die Bildung von Tumoren. Zum Vergleich zeigten HCT116 PPAR δ -null Zellen, bei denen der Rezeptor genetisch ausgeknockt wurde, keine derartige Aktivität [Park et al., 2001]. Zur Chemoprävention von Dickdarmkrebs sind nach dieser Hypothese Substanzen geeignet, die sowohl COX-Inhibitoren als auch potente PPAR δ -Liganden sind [Shiff et al., 1995; Piazza et al., 1997; He et al., 1999; Ma et al., 2005; Fukumoto et al., 2005; Yu et al., 2005].

2.11 Kolonkarzinome und Ernährung

Die Folge der durch Mutation hervorgerufenen genetischen Veränderungen während der Kolonkarzinogenese ist die Expansion von Zellen. Auf zellulärer Ebene ist dieses Geschehen durch eine Hyperproliferation, eine Hemmung der Differenzierung und einen Rückgang der Apoptose, charakterisiert. Die Entstehung derartiger Tumore ist ein typisches Beispiel einer multifunktionellen Erkrankung. Sie ist nicht nur von genetischen Faktoren determiniert, sondern auch im hohen Maße von Umwelteinflüssen. Chemische, physikalische und biologische Komponenten greifen in die verschiedenen Stufen der Initiation, Promotion und Progression ein. Befunde haben gezeigt, dass die Häufigkeit von Kolonkarzinomen in verschiedenen Ländern sehr unterschiedlich ist. In Asien, Afrika und Südamerika ist die Erkrankungsrate geringer als in westlichen Industrieländern. Diese Tendenz ist ein klares Indiz dafür, dass neben genetischen Faktoren auch Umwelteinflüsse, wie zweifelsohne die Ernährung, eine wesentliche Rolle bei der Genese von Darmkrebs spielen muss. In diesem Zusammenhang soll in der vorliegenden Arbeit der Effekt von in der Nahrung natürlich vorkommenden Fettsäuren auf Krebszelllinien untersucht werden, um mögliche protektive Wirkungen zu charakterisieren.

2.12 Proliferation, Differenzierung und Expression von Markergenen

Der Einfluss der mehrfach ungesättigten und verzweigt-kettigen Fettsäuren in der Kolonkarzinogenese soll am Modellsystem der Caco-2 Zellen untersucht werden. Diese Zelllinie ist in der Lage, nach Abschluss der Proliferation direkt in die Differenzierung überzugehen. Untersucht werden kann die Behandlung der Zellen mit PPAR-aktivierenden Substanzen während der Proliferation und gleichzeitig die mögliche Induktion zur Differenzierung durch PPAR-Liganden. Als Marker des Differenzierungszustandes von Kolonzellen gelten die Alkalische Phosphatase und die Saccharase-Isomaltase. Beides sind Enzyme der Bürstensaummembran in den Mikrovilli von intestinalen Zellen. Nach Pinto et al. (1983) steht die Enzymaktivität in direktem Zusammenhang mit dem Grad der morphologischen und biochemischen Differenzierung der Zelle. Durch Bestimmung der Aktivität der intestinalen Alkalischen Phosphatase lässt sich die Auswirkung verschiedener Fettsäuren auf die Differenzierung untersuchen. Die Saccharase-Isomaltase- und zusätzlich die IAP-Aktivität können anhand von Promotorstudien ermittelt werden. Sind die Fettsäuren in der Lage, in den APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweg einzugreifen und eine mögliche Differenzierung auszulösen, dann müssen die Promotoraktivitäten dieser Marker beeinflussbar sein. Zusätzlich werden auch die bekannten Differenzierungsmarker Carcinoembryonic Antigen (CEA) und intestinales fatty acid binding protein (iFABP) untersucht [Mariadason et al., 2000]. In vivo konnte eine Induktion dieser Enzymaktivitäten bereits 1992 von Young et al. festgestellt werden.

Um eventuelle zelluläre oder speziesbezogene Unterschiede herauszuarbeiten, soll der Einfluss der Fettsäuren auf die Proliferation anhand unterschiedlicher Zelllinien untersucht werden. Sich in der Proliferation befindende Zellen weisen eine erhöhte Stoffwechselaktivität auf, die anhand eines Enzymassays (Promega, G3582) photometrisch gemessen werden soll (Abschnitt 5.5.3). Weiterhin wird die Expression von Targetgenen der Proliferation analysiert. Hierfür kommen die Zielgene des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges, *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* in Frage.

2.13 Apoptose

Die Apoptose ist ein wichtiger Prozess mit großer Variabilität innerhalb von biologischen Systemen. Zusammen mit Proliferation und Differenzierung reguliert diese Form des programmierten Zelltodes das Gleichgewicht zwischen Verlust und Zugewinn an Zellen, welches für den Aufbau in der Embryogenese, den Erhalt der verschiedenen Gewebe, aber auch bei pathologischen Geschehen unerlässlich ist [Hale et al., 1996]. Die Apoptose verläuft in zwei Phasen. Die Zelle wird in den Apoptosezyklus überführt, um anschließend eine stereotyp ablaufende morphologische Veränderung der Zellstruktur durchzumachen [Takahashi et al., 1996]. Zuerst erfolgt eine Kondensation des Chromatins entlang der durch Schrumpfung gefalteten Kernmembran mit anschließender Fragmentation des Chromatins. Diese Chromatinkondensation kann mit einer Acridine Orange-Färbung der Zellen detektiert werden (Abschnitt 5.7.2). Alle Faktoren der Initiierungsphase des Zelltodes führen zur Aktivierung von proteolytischen Enzymen. Eine Reihe dieser Proteasen wurden charakterisiert, wobei die Interleukin 1 β (IL-1 β)-converting enzyme (ICE-like) Proteasen besonders hervorgehoben werden. Es wurde beobachtet, dass die vermehrte Bildung von ICEs die Apoptose induzieren kann und diese somit eine wichtige Rolle spielen müssen [Yuan et al., 1993; Miura et al., 1993]. In den nächsten Jahren wurden weitere ICE-like Proteasen identifiziert. Der Trivialname dieser Familienmitglieder ist Caspase. Das „C“ steht für Cystein-Protease, und „aspase“ bezeichnet die Fähigkeit des Enzyms, nach einem Aspartatsäurerest Proteine zu spalten. Caspasen besitzen die Fähigkeit zur eigenen Prozessierung, können aber auch Teil einer Kaskade darstellen und andere Caspasen aktivieren. Man unterscheidet Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10), die am Anfang einer Signalkette stehen, und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7), die von den Initiatorcaspasen aktiviert werden und dann ihrerseits andere Substrate abbauen können [Raghupathi et al., 2000]. Die Caspase-3 ist eines der Schlüsselenzyme der Apoptose [Fernandes-Alnemri et al., 1994] und kann durch einen Enzymtest gemessen werden (Abschnitt 5.7.3). Sie ist verantwortlich für die proteolytische Spaltung des nukleären Enzyms PARP (Poly-(Adenosindiphosphat-ribose)-Polymerase). PARP ist in der Lage, an DNA-Stränge zu binden und dort Brüche zu erkennen und zu beheben [Casciola-Rosen et al., 1996]. Wenn PARP durch Caspase-3 gespalten wird, kann es seine Funktion nicht mehr erfüllen, und es kommt

zum programmierten Tod der Zelle. Die Caspase-3 wird zunächst als inaktives Pro-Caspase-3 Enzym exprimiert. Die Prodomäne wird dann initial an einem Aspartatsäurerest in das aktive Enzym Caspase-3 gespalten [Nicholson et al., 1995]. Zu den Aktivatoren der Caspase-3 zählen die Caspase-8 und das Granzym B. Granzym B gehört zu der Familie der Serin-Proteasen und kann Caspase-3 sowohl in vitro als auch auf physiologischem Weg aktivieren [Darmon et al., 1995; Quan et al., 1996].

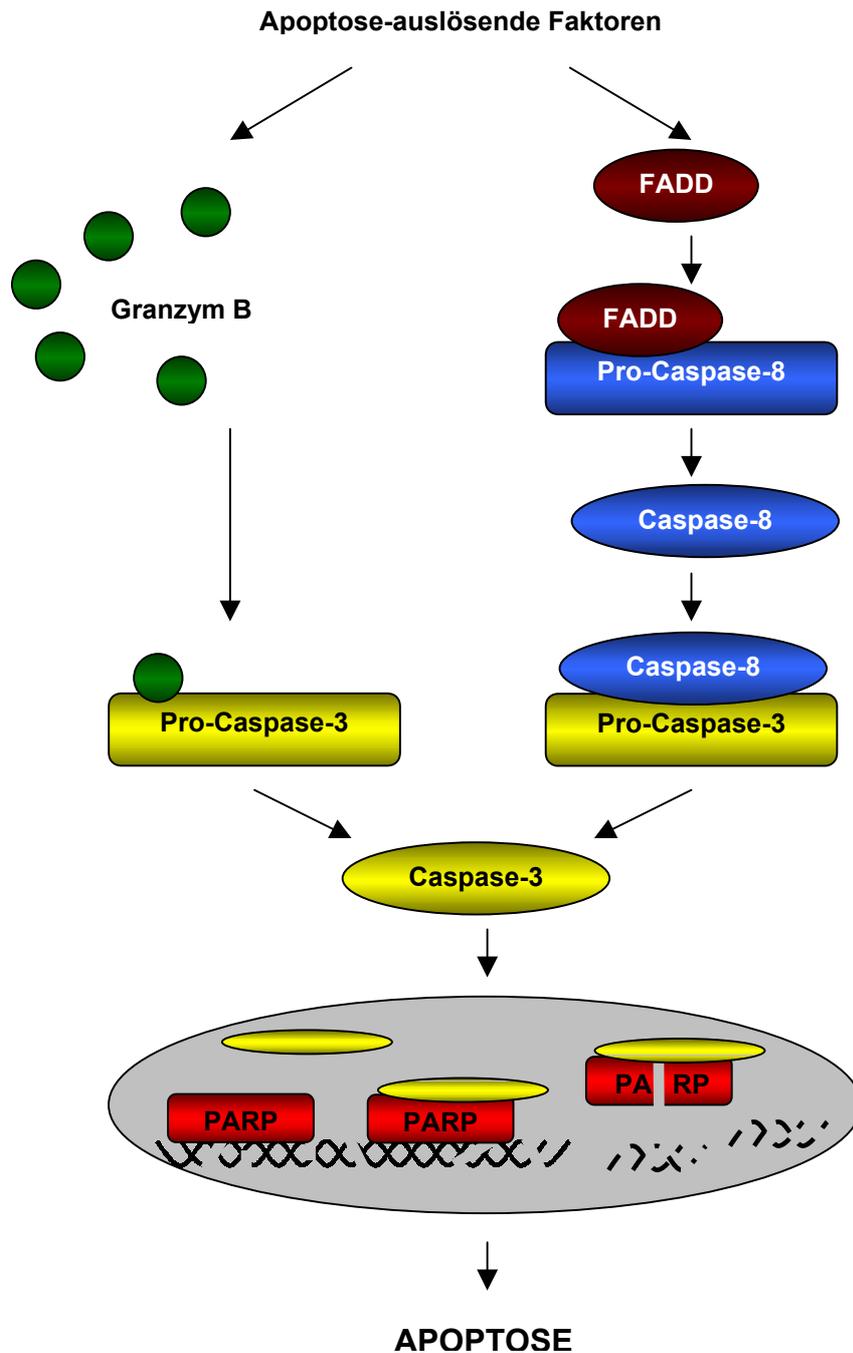


Abbildung 2-9: Signaltransduktion der Apoptose am Beispiel von Caspase-3.

Die Aktivierung der Caspase-3 kann durch spezifische Inhibitoren verhindert werden. Einer dieser Inhibitoren ist das antiapoptotisch wirkende Protein Bcl-2, ein bei Säugetieren vorkommendes Homolog des CED-9-Proteins von *C.elegans* [Hengartner et al., 1994], welches die gestartete Apoptosekaskade blockiert. Wirken nun Substanzen auf die Zelle ein, die eine Apoptose auszulösen vermögen, wird die Apoptosekaskade gestartet und die bcl-2 Expression sinkt.

Wird die Apoptose nur schwach stimuliert, spielen mitochondriale Auflösungsprozesse mit der Freisetzung von Cytochrom C eine entscheidende Rolle [White et al., 2000; Puka-Sundvall et al., 2000]. Leiten Fettsäuren die Apoptose ein, steigt der Gehalt an Cytochrom C im Cytosol der Zelle an. Eine verminderte Konzentration an Glutathion, die direkt mit der Freisetzung des Cytochrom C aus den Mitochondrien assoziiert ist, kann ebenfalls in apoptotischen Zellen gemessen werden [Hall et al., 1999]. Während der Apoptose verändert sich die Zellmembran durch Translokation von Phosphatidylserin im Lipidbilayer an die Oberfläche. Auf diese Weise kann ein weiteres Protein, das Annexin V, an die Phosphatidylserine binden und fungiert als weiterer Apoptosemarker mit steigender Konzentration während des programmierten Zelltodes [Cruikshank et al., 1987].



Abbildung 2-10: Schema der Apoptoseprozesse einer Zelle und ihre messbaren Veränderungen.

3 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung und Analyse präventiver Effekte von einfach und mehrfach ungesättigten und verzweigtkettigen Fettsäuren, im Hinblick auf die Induktion von Kolonkarzinomen, sowie die Erkennung ihres möglichen toxischen Potentials. Einige Untersuchungen deuteten darauf hin, dass Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) eine mögliche Rolle in der Kolonkarzinogenese spielen könnten. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei vor allem auf PPAR δ . Im Folgenden sollten ausgewählte konjugierte Linolsäureisomere (CLAs), als Beispielsubstanzen für mehrfach ungesättigte Fettsäuren, sowie die Phytansäure, als verzweigtkettige Fettsäure (wie VPA, Kapitel 2.7) und RXR-Ligand, in verschiedenen humanen Kolon-Zelllinien untersucht werden. Weiterhin sollte ebenfalls die Trans-Vaccensäure (TVA), die bisher nur als Precursor für CLAs bekannt war, charakterisiert werden, um mögliche spezifische Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufstellen zu können.

Die Entstehung von Kolonkrebs ist häufig mit einer Mutation im *apc*-Gen verbunden und führt zu einer Induktion des β -Catenin-TCF-4 Signalweges und daraus resultierend zu einer Induktion von PPAR δ . Weitere Zielgene der β -Catenin Kaskade sind *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun*, die als Proliferationsgene das Tumorstadium fördern.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde für die vorliegende Arbeit die Hypothese formuliert, dass bestimmte Fettsäuren einen möglichen präventiven Effekt bei der Entstehung von Kolonkarzinomen haben, indem sie die Proliferation hemmen, die Differenzierung induzieren und eventuell in die Apoptose der Zellen eingreifen. Weiterhin ist der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor PPAR δ direkt an der Karzinogenese beteiligt und hat eine regulierende Funktion während der Proliferation.

Um diese Hypothese zu untersuchen, war es das Ziel dieser Arbeit, die Wirkungen von verschiedenen Fettsäuren auf humane Kolonzelllinien darzustellen und mit molekularen Mechanismen zu korrelieren. Zur Aufklärung und möglichen Bestätigung der Arbeitshypothese wurden diverse Aspekte untersucht.

- 1) Um mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für PPAR δ -Aktivatoren formulieren zu können, sollten eine Auswahl von Isomeren der CLAs, TVA und Phytansäure auf ihre Affinität, PPAR δ zu aktivieren, analysiert und charakterisiert werden.
- 2) Der Retinoid Rezeptor RXR fungiert als Heterodimerpartner von PPAR δ und hat Phytansäure als Liganden. Im Reporterassay werden ausgewählte CLA-Isomere auf ihre spezifische Aktivierung von RXR und RAR hin untersucht, um Korrelationen zwischen PPAR δ -Liganden und RAR- und/oder RXR-Aktivatoren zu finden und mögliche synergistische Effekte ableiten zu können.
- 3) In Tumorgewebe liegt eine Hyperproliferation der Zellen vor. Alle Testsubstanzen werden auf ihren Einfluss in der Proliferationsphase verschiedener humaner Kolonkarzinom-Zelllinien getestet. Eine mögliche Proliferationshemmung wird durch Messung der Stoffwechselaktivität der Zellen bestimmt.
- 4) Liegt eine Hemmung der Zellproliferation vor, soll durch die Erstellung von Genexpressionsprofilen bekannter Markergene eine Korrelation zwischen molekularen Mechanismen der Krebsentstehung und Wachstumsinhibierung der Zellen hergestellt werden.
- 5) Können die untersuchten Lebensmittelinhaltsstoffe eine Proliferationshemmung der Kolonzelllinien einleiten, werden sie auf ihre Differenzierungsfähigkeit hin überprüft. Charakterisiert wird die Differenzierung durch Messung der Enzymaktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase, als Markerenzym in der Bürstensaummembran von differenzierten Kolonzellen. Weiterhin erfolgen Promotorstudien diverser Differenzierungsmarker wie IAP, CEA, SI und iFABP.
- 6) Zur Aufklärung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges, der in Tumorgewebe erhöht exprimiert ist, werden Caco-2 Kolonkarzinomzellen mit Wildtyp- sowie mutierten Komponenten dieser Kaskade in unterschiedlichen Kombinationen co- und triple-transfiziert. Anhand von Luciferaseaktivitätsmessungen soll die Wirkung der Fettsäuren auf die einzelnen Komponenten analysiert und verglichen werden.

- 7) In der Karzinogenese spielen Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Zum besseren Verständnis soll der molekulare Einfluss der Testsubstanzen auf den Marker der Zelladhäsion, β -catenin, anhand von Genexpressionsprofilen und Proteinexpressionsmustern in HT29 Zellen charakterisiert werden.
- 8) In Kolonkarzinomen ist die natürliche Apoptoseregulation gestört. Wenn sich die Fettsäuren als mögliche Proliferationshemmer erweisen, soll eine Korrelation zwischen ihrer wachstumsinhibierenden und eventuell apoptoseinduzierenden Wirkung hergestellt werden. Die Aktivierung des Apoptosemarkers Caspase-3 wird anhand enzymatischer Reaktionen photometrisch gemessen.

Als weitere Komponente dieser Arbeit soll ein besonderes Augenmerk auf PPAR δ gelegt werden. Wenn bestätigt werden kann, dass die ausgewählten Fettsäuren in die Proliferation, Differenzierung, Zelladhäsion und Apoptose von Kolonzellen eingreifen können, wird im zweiten Teil dieser Arbeit die Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ konkretisiert.

- 9) Um die molekularen Mechanismen von PPAR δ in der Signaltransduktion aufzudecken, sollen stabil hPPAR δ -überexprimierende und -reprimierende Caco-2 Kolonkarzinomzelllinien generiert werden. Durch den Vergleich der Proliferation, der Expressionsprofile möglicher Targetgene, sowie der veränderten Zelldifferenzierung und Apoptose in Rezeptor überexprimierenden und reprimierenden Caco-2 Zellen mit Wildtypzellen, sollen molekulare Strukturen und mögliche Zielgene von PPAR δ identifiziert werden können.
- 10) Zur weiteren Analyse der PPAR δ -Funktion während der Proliferation von Kolonkarzinomen, sollen unterstützend nicht transformierte HCT116 Wildtypzellen, die natürlicherweise PPAR δ überexprimieren, herangezogen werden. Zum besseren Vergleich wird das Proliferationsprofil von HCT116 hPPAR δ $-/-$ Zellen, bei denen der Rezeptor auf Genebene homolog zerstört wurde, herangezogen.

Durch einen Vergleich aller Ergebnisse und eine Aufstellung möglicher Korrelationen soll resultierend geklärt werden, ob spezifische Struktur-Aktivitäts-Unterschiede der einzelnen Testsubstanzen bestimmte molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese steuern. Unterliegen alle Fettsäuren unabhängig ihrer Kettenlänge oder Verzweigung den gleichen Mechanismen? Weiterhin soll geklärt werden, ob von bestimmten Fettsäuren eine mögliche protektive Wirkung im Bezug auf Kolonkrebs ausgeht. Wenn sich herausstellt, dass PPAR δ eine negative Rolle in der Karzinogenese zukommt und konjugierte Linolsäureisomere den Rezeptor positiv beeinflussen, könnten bestimmte CLAs als Lebensmittelinhaltsstoffe in Form von Functional Food in Zukunft Verwendung finden.

4 Material

4.1 Verwendete Geräte

NUAIRE™ Brutschrank	Zapf Instrumente, Sarstedt
Sterilbank	Integra Biosciences, LaminAir, Modell 1.8
Wasserbad	GFL, Typ 1013
Mikroskop	Carl Zeiss, Axiovert 25, Oberkochen
Elektrophoresekammern	Horizon, 1114, Life Technologies
Spannungsquelle	BIOMETRA Power Pack P25
Ultrazentrifuge	Beckmann, Avanti J-25 I
Tischkühlzentrifuge	Beckmann, Mikrofuge® R
Heizblöcke	BIOMETRA TBI Thermoblock, Göttingen
UV-Photometer	Perkin Elmer, Lamda Bio 20, Überdingen
Speedvac	Eppendorf, Concentrator 5301
Photodokumentationssystem	BioRad, GelDoc 1000, Software Molecular Analyst Vers. 1.4

4.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalkanülen NORM-JECT® (0,9 x 40 mm)	Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Einmalspritzen NORM-JECT® (2 ml)	Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Gewebekulturflaschen mit Filter, steril (50 und 250 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen, steril (15 und 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter (0,2 µm)	Nalgene, Rochester, USA
Pipettenspitzen, diverse, steril	Biozym
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Plastibrand®, Brand Laborgeräte
96-Well Mikrotiterplatten	NUNC
24- und 6-Well Platten	Sarstedt

4.3 Laborhilfsmittel

Zählkammer	Fuchs-Rosenthal, Omnilab, Gehrden
Pipetten, diverse	Eppendorf, Research®
Gummi-Zellschaber	Omnilab, Gehrden

4.4 Substanzen

Tabelle 4-1: Liste der verwendeten Substanzen und jeweilige Bezugsquellen.

Produktname	Chemischer Name	Bezugsquelle
9cis, 11trans-CLA	9(Z),11(E)-Octadecadiensäure	Biotrend, Köln
10trans, 12cis-CLA	10(E),12(Z)-Octadecadiensäure	Biotrend, Köln
9trans, 11trans-CLA	9(E),11(E)-Octadecadiensäure	Biotrend, Köln
Phytansäure	3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure	Sigma, Steinheim
Trans-Vaccensäure	11trans-Octadecadiensäure	Sigma, Steinheim
at-Retinsäure	Tretinoin	Sigma, Steinheim
CD2608 (LG1069)	(4-[1-(4,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)ethyl]benzoic acid	U. Reichert
CD3159 (LG100754)	[(2E,4E,6Z)-7(3-N-propoxy-5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-naphthalen-2-yl)-3-methylocta-2,4,6-trienoic acid]	U. Reichert
Valproinsäure	2-Propylpentansäure	Sigma, Steinheim
Bromopalmitat	2-Bromopalmitat	Sigma, Steinheim
Indomethacin	1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indoleacensäure	Sigma, Steinheim
Wy-14643	[4-Chloro-6-(2,3-dimethylphenylamino)pyrimidin-2-ylsulfanyl]-essigsäure	M. Göttlicher

4.5 Reagenzien und Chemikalien

4.5.1 Reagenzien und Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten

desoxy-Nukleotid-Triphosphat-Lösungen (A,C,G,T)	GIBCO™, Invitrogen
DNA-Agarose	Carl Roth GmbH Co
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Längenstandard 100 bp	GIBCO™, Invitrogen
Oligo-(dT)-Primer	Roche Diagnostics
PCR-Puffer (10x)	Qiagen GmbH, Hilden
Q-solution (5x)	Qiagen GmbH, Hilden
RNA-Agarose Ultra-Pure™	GIBCO™, Invitrogen
RNasin® R-Nase Inhibitor	Promega, Madison, USA
SuperScript™ II Rnase H Reverse Transkriptase	GIBCO™, Invitrogen
Superscript-Puffer (5 x) RNA-Polymerase-Puffer	GIBCO™, Invitrogen
Taq DNA-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden

4.5.2 Reagenzien für die Zellkultur

Fötale Kälber-Serum (FKS)	Cytogen, Lohmar
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO™, Invitrogen
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (F-12)	GIBCO™, Invitrogen
Insulin-Transferrin-Selenium Supplement X (ITS)	GIBCO™, Invitrogen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	GIBCO™, Invitrogen
Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 % Try/5,3 mM EDTA x4Na)	GIBCO™, Invitrogen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
α-tocopherol-phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Metafectene™	Biontex GmbH, München
G418	Calbiochem

4.5.3 Sonstige Chemikalien

Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Bicinchoninsäure – Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
D-Mannitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung	AppliChem, Darmstadt
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidinthiocyanat (GTC)	Carl Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Fluka, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfer-(II)-sulfat	Merck, Darmstadt
Luciferin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Morpholino-1-propansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Riedel-de-Haën, Seelze
Natrium-Lauryl-Sarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Phenol, wassergesättigt	Carl Roth, Karlsruhe
p-Nitrophenol-Lösung (10 µmol/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
tri-Natrium-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel-de-Haën, Seelze

4.6 Zelllinien

- Caco-2 Zellen: Humane epitheliale Kolonkarzinom-Zelllinie. 1974 isoliert aus dem Tumor eines männlichen Weißen. Können nach der Proliferationsphase in die Differenzierung übergehen. Haben 170 kDa große Form der APC-Mutation und werden für Studien von molekularen Signalwegen im Bezug auf Zellzyklus und Differenzierung genutzt.
- HT29 Zellen: Humane epitheliale Kolonkarzinom-Zelllinie. 1964 isoliert aus dem Tumor einer weißen Frau. Haben mutiertes APC (-/-) und exprimieren aus der TCF-Familie nur den Faktor 4.
- HCT116 Zellen: Humane nicht transformierte epitheliale Kolonkarzinom-Zelllinie; isoliert aus einem männlichen Organismus. Exprimieren full-length APC (WT) und haben durchgehend aktive CRT (β -catenin-TCF-regulierte Transkription). Deletion von Serin 45 im *β -catenin* Gen. Im Wild Typ genotypische *PPAR δ* Überexpression (*PPAR δ* +/+). Stabile Knockout Zellen durch homologe Zerstörung von *PPAR δ* [Park et al., 2001].
- HEK293 Zellen: Humane embryonale Nieren-Zelllinie; hohe Transfektions-effizienz; haben niedrige endogene CRT und viel endogenes APC.
- F9 Zellen: pluripotente embryonale Teratokarzinom-Stammzelllinie aus der Maus.

4.7 Rezeptorkonstrukte und Plasmide

4.7.1 Rezeptorkonstrukte

pGal4-hPPAR δ	Liganden-bindende Region des humanen Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ ; dient zu Aktivierungsstudien durch Testsubstanzen
pcDNA3.1-hPPAR δ	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor δ - cDNA zur Generierung von PPAR δ überexprimierenden Caco-2 Klonen; enthält G418 Resistenzgen
pcDNA3.1-hPPAR δ DN	inaktive PPAR δ Mutante durch Wechsel der Glutaminsäure an Stelle 411 in Prolin im Loop vor der hormonabhängigen Aktivierungs-Funktion-2 Domäne (AF-2); Rezeptor kann noch Liganden binden, aber keine Co-Repressoren mehr übertragen und verliert so seine Transkriptionsaktivität; dient zur Generierung von PPAR δ reprimierenden Caco-2 Klonen; enthält G418 Resistenzgen

Alle Rezeptorkonstrukte wurden von Prof. Dr. Paul A. Grimaldi, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U470, Centre de Biochimie, Parc Valrose, UFR Sciences, Université de Nice-Sophia Antipolis, 06108 Nice, France, zur Verfügung gestellt.

4.7.2 Plasmide

pPPRE-TK-Luc	Peroxisomen Proliferator Response Element; dient bei Transfektion von Caco-2 Klonen zum Nachweis der Stabilität des Rezeptors
pUAS-TK-Luc	Luciferase-Reporterkonstrukt zur Co-Transfektion mit Plasmiden ohne Luciferase-Gen
pCMX-Gal4-hRXR α	Retinoid X Rezeptor; wirkt als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, indem er an DNA-Sequenzen (Response-Elemente) in der Promotorregion von Zielgenen bindet; fungiert als stiller Partner oder trägt mit Liganden als aktiver Heterodimerpartner zur Signaltransduktion bei; kann mit PPARs Heterodimere bilden; wenn Testsubstanzen PPARs aktivieren, könnten auch RXRs Aktivität zeigen
pCMX-Gal4-hRAR α	Retinsäure-Rezeptor; geringe Homologie der LBD von RAR und RXR; at-RA ist spezieller RAR-, aber kein RXR-Ligand
pTOPFLASH	TCF-Reporterkonstrukt mit Luciferase-Gen; enthält 3 Kopien der TCF-binding site; wird bei der Aufklärung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges zur Co-Transfektion genutzt
pFOPFLASH	TCF-Reporterkonstrukt mit Luciferase-Gen, das eine mutierte TCF-binding site in 6facher Kopie enthält; eingesetzt zur Co-Transfektion bei der Aufklärung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges und Negativkontrolle von pTOPFLASH

Material

pCi-neo-wt β -catenin	humanes wt β -catenin; dient durch Vergleich mit der mutierten Variante (Δ 45) zur Aufklärung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges; nur in Verbindung mit humanem TCF-4 stark aktiviert; gesamte Kaskade während der Proliferation induziert
pFLAG-CMV-5/h β -cat Δ 45	humanes β -catenin aus HCT116 Zellen; heterozygote Deletion des Serin an Stelle 45; im Gegensatz zum wt β -catenin ist Δ 45 in Verbindung mit endogenem APC stark hochreguliert und durch dominant-negativen hTCF-4 inhibiert; dient zur Aufklärung des β -Catenin-TCF-4 Signalweges und wird mit pTOPFLASH cotransfiziert
pcDNA3.1-hTCF-4	humaner TCF-4 in 3 Kopien zur Funktionsanalyse der Interaktion mit β -catenin; in Co-Transfektion mit wt β -catenin und pTOPFLASH stark aktiviert
pcDNA3.1- Δ N-hTCF-4	dominant negativer humaner TCF-4 zur Funktionsanalyse der Interaktion mit β -catenin

Alle Plasmide für die Aufklärung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signaltransduktionsweges wurden von Dr. Marc van de Wetering, Hubrecht Laboratory, Center for Biomedical Genetics, 3584 CT Utrecht, The Netherlands, zur Verfügung gestellt.

Material

pMyc-SEAP	<p>Plasmid zur Bestimmung der cMyc-Aktivität und des Signaltransduktionsweges; Protein bildet heterodimere Komplexe und initiiert die Transkription von Genen der zellulären Proliferation; wenn Testsubstanzen eine protektive Wirkung haben, dann sollte die cMyc-Aktivität inhibiert werden</p> <p>Bezug: Clontech</p>
pIAP _{2,4} -Luc	<p>Promotorregion der Intestinalen Alkalischen Phosphatase; terminaler Differenzierungsmarker in der Bürstensaum von Kolonzellen; sollte durch Testsubstanzen angeschaltet werden, wenn Fettsäuren krebspräventiv wirken</p> <p>Bezug: Dr. Madhu S. Malo, MGH/Harvard Medical School, Jackson 812, 55 Fruit Street, Boston, MA 02114</p>
pGL3-CEA	<p>Carcinoembryonic antigen; onkofetales Glycoprotein, das in zur Differenzierung induzierten Zellen überexprimiert wird; sollte bei positiver Wirkung der Testsubstanzen induziert werden</p> <p>Bezug: Dr. John M. Mariadason, Department of Oncology, Montefiore Medical Center, Albert Einstein Cancer Center, 111 East 210th Street, Bronx, NY 10467</p>
pGL3-SI200	<p>enthält den Promotor der Saccharase-Isomaltase; Enterozyten-spezifisches Genprodukt in der Differenzierungsphase; sollte bei protektiver Wirkung der Testsubstanzen vermehrt vorliegen</p> <p>Bezug: DMSc Jørgen Olsen, Department of Medical Biochemistry and Genetics, University of Copenhagen, The Panum Institute Bldg. 6.4, Blegdamsvej 3, DK-2200N</p>

Material

pGL3-iFABP	<p>Promotorregion des intestinalen „Fatty acid binding protein“; terminales Differenzierungsgen; bei Ausdifferenzierung von Caco-2 Zellen erhöht exprimiert; sollte bei positivem Einfluss der Testsubstanzen induziert werden.</p> <p>Bezug: Dr. Todd Evans, Department of Development and Molecular Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York</p>
pAP1-Luc	<p>Aktivator-Protein 1-Transkriptionsfaktor; steuert basale und induzierte Expression von Genen der Proliferation und Zellzyklus-Progression; formt Multiprotein-Komplexe mit Produkten der <i>c-jun</i> und <i>c-fos</i> Protoonkogen-Familien; Aktivität sollte bei protektiver Wirkung der Testsubstanzen inhibiert werden</p> <p>Bezug: Clontech</p>

In der nachfolgenden Tabelle 4-2 sind die jeweiligen Plasmide mit Namen, Vektor und kloniertem Insert aufgelistet.

Tabelle 4-2: Plasmidnamen und Klonierung.

Name	Vektor	Insert
pGal4-hPPAR δ	pGal4	humane hPPAR δ LBD
pPPRE-TK-Luc	Luciferasereporter	humane PPRE LBD
pUAS-TK-Luc	pUAS-TK	Luciferase-Gen
pCMX-Gal4-hRXR α	pCMX-Gal4 (N)	humane RXR α LBD
pCMX-Gal4-hRAR α	pCMX-Gal4 (N)	humane RAR α LBD
pTOPFLASH	pcFos-Luciferase	TCF-binding site
pFOPFLASH	pcFos-Luciferase	mutierte TCF-binding site
pCi-neo-wt β -catenin	pCi-neo	humanes β -catenin
pFLAG-CMV-5/h β -cat Δ 45	pCMV-5	Ser ⁴⁵ deletiertes β -catenin aus humanen HCT116 Zellen
pcDNA3.1-hTCF-4	pcDNA3.1	humaner TCF-4
pcDNA3.1- Δ N-hTCF-4	pcDNA3.1	dominant-negativer humaner TCF-4
pMyc-SEAP	secreted alkaline phosphatase reporter gene	cMyc DNA binding element
pIAP _{2,4} -Luc	pGL3-Basic Luciferase Reporter	IAP Promotor Region (-2574 bis - 49)
pGL3-CEA	pGL3-Basic Luciferase Reporter	carcinoembryonic antigen Promotor
pGL3-SI200	pGL3-Basic Luciferase Reporter	sucrase-isomaltase Promotor
pGL3-iFABP	pGL3-Basic Luciferase Reporter	intestinal fatty acid-binding protein Promotor
pAP1-Luc	Luciferase Reporter	Activator Protein 1 enhancer
pcDNA3.1-hPPAR δ	pcDNA3.1	humane PPAR δ cDNA
pcDNA3.1-hPPAR δ DN (pcDNA3.1-hPPAR δ -E411P)	pcDNA3.1	inaktive Form, Glutaminsäure an Position 411 in Prolin geändert

4.8 Semiquantitative RT-PCR

4.8.1 Untersuchte Gene für die Durchführung von Expressionsanalysen

human <i>c-myc</i>	Protoonkogen; besteht aus drei Exons, wobei das erste Exon eine nicht-translatierte Leader-Sequenz darstellt, während die beiden anderen das c-Myc-Protein codieren; wird für die Transkription zahlreicher Gene benötigt, die im Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen; während der Proliferation hochreguliert.
human <i>cyclin D1</i>	Protoonkogen; codiert Protein, welches neben anderen, den Zellzyklus steuert und kontrolliert; durch die Überexpression von <i>cyclin D1</i> , beispielsweise hervorgerufen durch die Mutation eines Tumorsuppressorgens (z.B. <i>apc</i>), wirkt das translatierte Protein in Verbindung mit anderen onkogen.
human <i>c-jun</i>	Protoonkogen; wirkt als Onkoprotein, da es die Transkription wichtiger wachstumsstimulierender Gene aktiviert; ebenso kann <i>c-jun</i> die Transkription von Genen inhibieren, die wachstumshemmende Proteine codieren.
human β - <i>catenin</i>	Proteincodierendes Gen; Catenine stellen eine Verbindung zwischen dem E-Cadherin in der Plasmamembran und dem nahe der apikalen Oberfläche liegenden Adhäsionsgürtel her; β -catenin ist ebenfalls bei der Signaltransduktion des APC- β -Catenin-TCF-4 Weges beteiligt und wird während der Proliferationsphase einer Zelle stark exprimiert.
human β - <i>actin</i>	„housekeeping-gene“; codiert wichtiges Strukturprotein der eukaryotischen Zelle; häufig zur Standardisierung bei Zielsuche mittels PCR verwendet.
human <i>PPARδ</i>	nukleärer ubiquitär vorkommender Rezeptor; involviert in Proliferation und Fettsäureakkumulation der Zelle.

4.8.2 Primer für Genexpressionsanalysen

Alle verwendeten Primer wurden mit dem Programm DNASIS für Windows Version 2.1 von Hitachi Software Engineering Co. Ltd. designiert. Anschließend wurden sie mit der Suchmaschine BLAST! (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verifiziert. Die Synthese der Primer übernahm die Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Sequenzen der Forward- und Reverse-Primer für die Expressionsanalysen der Gene aus Abschnitt 4.8.1 mit ihren Basengrößen des entstehenden Amplifikates aufgelistet.

Tabelle 4-3: Primersequenzen für die semi-quantitativen PCR-Analysen.

Gen	Sequenz	[bp]
human β -actin	Forward 5'- CTA CAA TGA GCT GCG TGT GG - 3'	350
	Reverse 5'- TAG CTC TTC TCC AGG GAG GA - 3'	
human <i>c-myc</i>	Forward 5'- CAG CTG GAG ATG GTG ACC GAG - 3'	343
	Reverse 5'- TCT TGC GAG GCG CAG GAC TTG - 3'	
human <i>cyclin D1</i>	Forward 5'- ATA GGT GTA GGA AAT AGC GCT - 3'	347
	Reverse 5'- TCC GGT GTG AAA CAT CTA AGA - 3'	
human <i>c-jun</i>	Forward 5'- ACG ACC TTC TAT GAC GAT GCC - 3'	302
	Reverse 5'- CTC CTG CTC ATC TGT CAC GTT - 3'	
human β -catenin	Forward 5'- CAG TGC GTT TAG CTG GTG GGC T - 3'	350
	Reverse 5'- TCC AGC TGC ACA GGT GAC CAC A - 3'	
human <i>PPARδ</i>	Forward 5'- CTT CCT GTC TTT GTT GTC TCC - 3'	342
	Reverse 5'- CCC AGA GAG CTT AGT GTT TCT - 3'	

5 Methoden

5.1 Zellbiologische Verfahren

5.1.1 Zellkultur unter Normalbedingungen

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen in einem CO₂-Brutschrank (Nuair, Zapf Instrumente, Sarstedt), wobei die Temperatur bei 37 °C lag und eine relative Luftfeuchtigkeit von 95 % bei einem CO₂-Gehalt von 5 % herrschte. In Tabelle 5-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit ihren entsprechenden Medien und Zusätzen aufgelistet.

Tabelle 5-1: Zelllinien, ihr Herkunftsorgan und spezifische Kulturbedingungen.

Zelllinie	Herkunftsorgan	Spezies	Kulturmedium
Caco-2	Kolon	Mensch	DMEM + 10 % FKS
HT29	Kolon	Mensch	DMEM + 10 % FKS
HCT116	Kolon	Mensch	McCoy's 5A + 10 % FKS
HEK293	Niere	Mensch	DMEM + 10 % FKS
F9	Embryonale Stammzelllinie	Maus	DMEM F-12 + 10 % FKS

Im Durchschnitt wurden alle Zellen im Rhythmus von zwei Tagen gefüttert. Die Passagierung erfolgte nach Absaugen des Mediums durch Behandlung des Zellrasens mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-PBS-Lösung; Endkonzentration 0,2 % Trypsin.

PBS

8 g NaCl
 0,2 g KCl
 1,43 g Na₂HPO₄ x 2H₂O
 0,2 g KH₂PO₄
 pH 6,8

Die Inkubationszeit der Trypsin-Lösung variierte je nach Zellart zwischen 1-5 min und wurde anhand der sich makroskopisch sichtbar ablösenden Zellen kontrolliert. Zum Abstoppen des Vorgangs wurden die Zellen in frischem, 37 °C warmen Medium aufgenommen und bei 500x g für maximal 5 min abzentrifugiert. Das hieraus resultierende Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und anschließend je nach Zellart im Verhältnis 1:3 bis 1:5 auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

5.1.2 Einfrieren der Zellen

Zur Langzeitlagerung der Zelllinien im Stickstoffbehälter wurden die Zellen nach Trypsinierung und Zentrifugation (s.o.) in speziellem schon auf 4 °C vorgekühlten Einfriermedium aufgenommen.

Einfriermedium

70 % normales Medium

20 % FKS

10 % DMSO

Der Zellinhalt einer 75 cm² Kulturflasche wurde hierbei auf 3 Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden anschließend in die Vertiefungen eines ebenfalls 4 °C kalten mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainers gesetzt und über Nacht in einer Gefriertruhe bei –80 °C aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellröhrchen zur permanenten Lagerung in einen Flüssigstickstoffbehälter bei –196 °C umgesetzt.

5.1.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad getaucht. Der Inhalt wurde anschließend in ein Falconröhrchen überführt und nach langsamer Zugabe von 10 ml 37 °C warmen Medium bei 500x g pellitiert. Die Aussaat erfolgte dann in einer mit 10 ml Medium gefüllten 25 cm² Zellkulturflasche. Nach ein bis zwei Tagen konnten die frisch aufgetauten Zellen in größere Kulturgefäße gesetzt und für Experimente entsprechend kultiviert werden.

5.1.4 Bestimmung der Zelldichte einer Suspension

Vor der Kultivierung der Zellen für die einzelnen Versuche wurde die Dichte der Zellsuspension ermittelt, um eine gleichmäßige Aussaat in die einzelnen Kulturflaschen bzw. Well-Platten zu gewährleisten. Die Bestimmung erfolgte mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, deren Zählfelder jeweils ein Volumen von 0,2 µl enthielten. 16 dieser Felder wurden ausgezählt und diese Zahl anschließend mit 5000, dem spezifischen Faktor der Kammer, multipliziert. Die so berechnete Zellzahl wurde in Zellen pro ml angegeben.

5.2 Mikrobiologische Verfahren

5.2.1 Transformation von Bakterienzellen

Die bei -80 °C gelagerten kompetenten E.coli Zellen des Stammes JM107 wurden auf Eis aufgetaut. Zu 200 µl dieser Bakteriensuspension wurden 1-5 µl DNA-Lösung (max. 10 ng) hinzupipettiert und alles anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C und einem nachfolgenden Abkühlen auf Eis wurden pro Ansatz 800 µl SOC-Medium zugegeben.

SOC-Medium

20 g Tryptone
5 g Yeast Extrakt
0,5 g NaCl
10 ml KCl-Lösung 250 mM
5 ml MgCl₂-Lösung 2 M
20 mM Glucose (immer frisch zugeben, nicht autoklavieren)
auf 1 l dest. H₂O geben und autoklavieren

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C in einem Inkubator (Fa. GFL) geschüttelt. Die vorinkubierten Bakterien wurden anschließend in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Fa. Heraeus) für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Medienüberstand wurde verworfen, und das entstandene Pellet diente mit 3 ml frischem LB-Medium als Vorkultur und kam über Nacht unter Schütteln bei 37 °C in den Brutschrank.

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
auf 1 l mit dest. H₂O auffüllen und autoklavieren

Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur von 200 ml LB-Medium mit 200 µl der Vorkultur angeimpft und erneut über Nacht auf die gleiche Weise inkubiert. Zu beachten war immer, dass ein für das jeweilige Plasmid entsprechender Selektionsmarker ab dem Zeitpunkt der Vorkultur in das LB-Medium gegeben wurde. In den überwiegenden Fällen enthielten die Plasmide ein Ampicillinresistenzgen, so dass dem Medium 50 mg Ampicillin pro Liter zugegeben werden musste.

5.3 Molekularbiologische Verfahren

5.3.1 Plasmidpräparation

Alle Plasmidpräparationen wurden mit dem Plasmid Midi/Maxi Kit von Qiagen durchgeführt, um eine hohe Reinheit der Plasmid-DNA zu gewährleisten. Die genaue Vorgehensweise kann im entsprechenden Handbuch „Qiagen Plasmid Purification Handbook 09/2000“ nachgelesen werden. Das am Ende entstandene DNA-Pellet wurde je nach Ausbeute in 100-250 µl MilliQ-H₂O aufgenommen.

5.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Quantifizierung des DNA-Gehalts wurde jede Probe 1:100 mit sterilem Wasser verdünnt und die Extinktion in einem Spektralphotometer bei 260 nm gemessen. Für die Konzentrationsberechnung lag die Formel 1 OD entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml zugrunde. Zu berücksichtigen war ebenfalls der Verdünnungsfaktor von 100.

$$\text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 50 = \text{Konzentration ng/}\mu\text{l bzw. }\mu\text{g/ml}$$

Abbildung 5-1: Formel zur Berechnung von DNA-Konzentrationen.

5.4 Transfektionen

5.4.1 Transiente Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Präzipitation

Das Prinzip der Calcium-Phosphat-Methode beruht auf der Mischung von DNA, CaCl_2 und Phosphatpuffer. Nach der Inkubation auf Eis entsteht ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA, der von den Zellen per Endocytose aufgenommen wird. Die Zellen transportieren die DNA zum Kern, wo sie erst transkribiert und anschließend translatiert wird. Bei transienten Transfektionen erreichen die Zellen je nach verwendetem Plasmid und Zelltyp ihr Expressionsmaximum 16-48 h nach der DNA-Zugabe. Die Transfektionseffizienz kann je nach Zelllinie variieren. Aufgeführt ist hier ein allgemeines Protokoll für die Calcium-Phosphat-Transfektion von adhärent wachsenden Zelllinien im 24-Well Format. Alle Angaben beziehen sich auf ein Well. Da die DNA-Konzentrationen je nach Plasmid variieren, wird hier ausschließlich der Begriff Plasmid-DNA verwendet. In Tabelle 5-2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren jeweilige Konzentration aufgelistet.

Transfektionsansatz

20 μl	Plasmid-DNA + dH_2O
25 μl	2xHBS
5 μl	CaCl_2 2,5M

2x HBS

11,9 g/l	HEPES
16,4 g/l	NaCl
10 mM	KCl
1,3 mM	Na_2HPO_4
2 g/l	Glucose

pH mit NaOH auf 7,1 einstellen, sterilfiltrieren, aliquotieren, - 20 °C lagern

2,5 M CaCl_2

autoklavieren, aliquotieren, -20 °C lagern

Methoden

Während der Zugabe des HBS-Puffers und der CaCl₂-Lösung wurde der Ansatz durchgehend gevortext. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 30 min auf Eis. 50 µl der Transfektionslösung wurden anschließend pro Well auf die Zellen gegeben. Nach 5-6 h wurde das Medium entfernt und die Zellen mit den zu testenden Substanzen behandelt. Die Dauer der Induktion richtete sich nach dem jeweiligen Versuchsaufbau und ist ebenfalls in Tabelle 5-2 aufgelistet.

Tabelle 5-2: Verwendete Plasmide, eingesetzte Konzentrationen und die versuchsabhängige Behandlungsdauer der Zellen.

Plasmid	Konzentration	Behandlungsdauer
pGal4-hPPAR δ	0,02 µg/ Well	48 h
pPPRE-TK-Luc	0,5 µg/Well	24 h
pUAS-TK-Luc	0,2-1µg/Well	je nach Versuch
pCMX-Gal4-hRXR α	0,1 µg/Well	36 h
pCMX-Gal4-hRAR α	0,1 µg/Well	36 h
pTOPFLASH	0,3 µg/Well	24 h
pFOPFLASH	0,2 µg/Well	24 h
pCi-neo-wt β -catenin	1,2 µg/Well	24 h
pFLAG-CMV-5/h β -cat Δ 45	1,2 µg/Well	24 h
pcDNA3.1-hTCF-4	0,9 µg/Well	24 h
pcDNA3.1- Δ N-hTCF-4	0,9 µg/Well	24 h
pMyc-SEAP	0,5 µg/Well	24 h
pIAP _{2,4} -Luc	2 µg/Well	24 h
pGL3-CEA	0,2 µg/Well	24 h
pGL3-SI200	0,4 µg/Well	24 h
pGL3-iFABP	0,2 µg/Well	24 h
pAP1-Luc	0,4 µg/Well	24 h

5.4.2 Stabile Transfektion zur Generierung überexprimierender bzw. reprimierender PPAR δ Kolonzellen

Um die beiden Plasmide pcDNA3-hPPAR δ +/- und pcDNA3-hPPAR δ DN stabil in Caco-2 Zellen transfizieren zu können, wurde das Transfektionsreagenz METAFECTENETM für Säugerzellen von Biontex (T020-1.0) verwendet. Hierzu wurden Caco-2 Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät und 30-40 % konfluent wachsen gelassen. Für jede Platte wurden die folgenden Lösungen zusammenpipettiert:

- Lösung 1 14 μ g der jeweiligen Plasmid-DNA wurden in 700 μ l (Gesamtvolumen) serum- und antibiotikafreiem Medium gelöst
- Lösung 2 70 μ l Metafectene wurden in 700 μ l (Gesamtvolumen) serum- und antibiotikafreiem Medium gelöst

Beide Lösungen wurden anschließend vereinigt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren miteinander gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur, in der ein DNA-Lipid-Komplex gebildet werden konnte, wurde die Transfektionslösung auf die Zellen gegeben. Da das Reagenz keine negativen toxischen Effekte zeigte, wurden die Zellen 48 h im Brutschrank unter Standard-Kulturbedingungen in DMEM + 10 % FKS transfiziert. Nach den 2 Tagen wurde das Medium mit der Transfektionslösung abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Um eine Selektion der stabil-transfizierten Zellen gegenüber den nicht-transfizierten Zellen zu erreichen, wurde der für die beiden PPAR δ -Plasmide spezifische Selektionsmarker G418 (Abschnitt 4.7.1) ab diesem Zeitpunkt der Kultivierung durchgehend zum Medium gegeben. Hierfür wurde in Vorversuchen mit steigender G418 Konzentration die toxische Konzentration von 500 μ g/ml für Caco-2 Zellen ermittelt. Die Caco-2 Zellen wurden solange auf der Petrischale in Kultur gehalten, bis sich makroskopisch sichtbare Kolonien gebildet hatten. Dies war im Durchschnitt nach 10 Tagen erfolgt. Nun wurden die Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 24-Well Platten vereinzelt. Sobald die Zellen in den Wells herangewachsen waren, wurden sie in 6-Well Platten und anschließend in kleine Kulturflaschen gesetzt und auf ihre Stabilität im Bezug auf die hPPAR δ -Expression hin getestet. Wurde eine erfolgreiche stabile Transfektion erreicht, konnten die entsprechenden Klone für nachfolgende Studien eingesetzt werden.

5.5 Enzymassays

5.5.1 Luciferase Assay

Nach Transfektion und entsprechender Induktion der Zellen mit den Testsubstanzen wurde die Aktivierung der einzelnen Plasmide mittels Luciferase gemessen. Hierzu mussten die Zellen mit 150 µl Lysispuffer pro Well einer 24-Well Platte bei -20 °C lysiert werden.

Lysis-Puffer

0,1 M Tris acetat pH 7,5
2 mM EDTA
1 % TritonX100
autoklavieren

Nach 30 min konnte die Aktivität der Luciferase ermittelt werden. 50 µl jeder Probe wurden mit 150 µl Assay-Puffer und 50 µl Luminol zusammenpipettiert und für 10 sec luminometrisch (Lumat 2, Berthold, Hameln) gemessen.

GlyGly-Puffer

25 mM Glycylglycerin
15 mM MgSO₄
4 mM EGTA
pH 7,8 einstellen und autoklavieren

Assay-Puffer

20 ml GlyGly-Puffer
40 µl DTT 0,5M
200 µl ATP 100 mM

Luminol

1 ml Luciferin-Stock (0,28 mg/ml)
4 ml GlyGly-Puffer

Die ausgegebenen Werte sind relative Lichteinheiten (RLU) der Luciferase. Die Mittelwerte aller unbehandelten Proben wurden bei der Auswertung (Software Microsoft® Excel 97) als Faktor 1 gesetzt. Auf ihn wurden alle Werte der behandelten Proben bezogen. Auf diese Weise konnte eine Aktivierung bzw. Reprimierung der Testsubstanzen im Bezug auf ein bestimmtes Plasmid nachgewiesen werden. Da bei diesen Versuchen mit lebenden Systemen gearbeitet wurde, wurden alle Reporterassays mehrfach und in jeweils mindestens Triplikates wiederholt (n>3).

5.5.2 Alkalische Phosphatase Assay zur Bestimmung der *c-myc* Promotoraktivität

Für die Messung der *c-myc* Aktivität wurden HEK293 Zellen verwendet [Lampen et al., 1999]. Die Transfektion wurde nach der Calcium-Phosphat-Methode (Abschnitt 5.4.1) durchgeführt und erfolgte nach Aussaat der Zellen in 24-Well Platten. Hierfür wurde das Plasmid pMyc-SEAP (Clontech S1884) mit einer Konzentration von 0,5 µg/Well eingesetzt. Während der 24stündigen Induktion der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Linolsäureisomere sezernierten die transfizierten Zellen das Enzym humane alkalische Phosphatase (AP) in das Kulturmedium. Am Ende der Inkubationszeit wurde aus jedem Well ein Aliquot von 500 µl Medium entnommen, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Die humane alkalische Phosphatase war bei dieser Temperatur noch stabil, während die endogene alkalische Phosphatase der Zellen sowie das im Kulturmedium befindliche Enzym schon hitzeinaktiviert wurden. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt. In eine 96-Well Mikrotiterplatte wurden 80 µl 4x Assay-Puffer und 20 µl Substratlösung pro Well vorgelegt.

4xAssay-Puffer

1 M Tris-HCl, pH 8,8
1,375 M NaCl
2,5 mM MgCl₂
autoklavieren und bei RT lagern

Substratlösung

100 mM PNPP (para-Nitrophenylphosphat)
immer frisch ansetzen und direkt verwenden

Anschließend wurden 225 µl Probe/Well hinzupipettiert. Für den Leerwert wurde statt der Probe 225 µl/Well normales Medium verwendet. Die Proben wurden bei 37 °C inkubiert und jede Stunde bei 405 nm in einer Anthos LUCY2 photometrisch gemessen. Hierbei musste nach 1 h, 2 h, 3 h und 4 h und bei Bedarf auch nochmals nach 5 h gemessen werden. Alle Extinktionswerte wurden mit der Software MikroWin 3.0 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath) aufgezeichnet. Bei der Auswertung mit Hilfe der Software Microsoft® Excel 97 wurde für jede Stunde ein Diagramm erstellt. Von allen Messwerten wurde der Leerwert abgezogen und der Mittelwert der Probe der nicht induzierten Zellen als Faktor 1 gesetzt. Alle weiteren Proben wurden auf diesen Wert bezogen.

5.5.3 Proliferationsassay

Die Messung des Proliferationsverlaufes diverser Zelllinien unter Einwirkung der Testsubstanzen wurde mit dem „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ (Promega, G3582) durchgeführt. Dieser Test ist ein colorimetrischer Nachweis zur Bestimmung der Anzahl lebender sich in Proliferation befindlicher Zellen. Das verwendete Reagenz enthält eine Tetrazolium-Komponente [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS] und ein Elektronen-Kopplungs-Reagenz (phenazine ethosulfate; PES). Die MTS Tetrazolium-Komponente wird von den Zellen in ein farbiges Formazan-Produkt reduziert, welches im Kulturmedium löslich ist. Metabolisch aktive Zellen produzieren durch ihre Dehydrogenasen NADPH oder NADH, was wiederum die Voraussetzung für die vollendete Umformung der MTS in ihre Reduktionsäquivalente ist. Der damit verbundene Farbumschlag wird anschließend bei 490 nm photometrisch (Dynatech MR5000, Dynatech Laboratories) gemessen.

Die verschiedenen Zelllinien wurden in einer definierten Zellzahl in ihrem jeweiligen Kulturmedium + 10 % FKS in 96-Well Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank unter Normalbedingungen inkubiert. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 100 µl. Die genauen Zellzahlen der einzelnen Zelllinien sind aus Tabelle 5-3 zu entnehmen.

Tabelle 5-3: Eingesetzte Zellzahlen der diversen Zelllinien im Proliferationsassay.

Zelllinie	Zellzahl pro Well
Caco-2 wt	5000
Caco-2 hPPAR δ Klone	5000
HT29	2500
HCT116 hPPAR δ Klone	3000
F9	1000

Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen induziert. Hierzu wurde serumfreies Medium + 1 % ITS (Insulin-Transferrin-Selenium-X Supplement (100x), Gibco 51500-056) und 0,1 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin, Sigma) verwendet. Zusätzlich kamen 50 ng/ml Ascorbinsäure und 20 ng/ml α -tocopherol-phosphat (beides von Sigma) in das Versuchsmedium. Diese Zusätze dienten zum Schutz der Fettsäuren vor Oxidation. Die zu testenden Substanzen wurden nach Kim et al. (2000) mit fettsäurefreiem BSA im molaren Verhältnis von 4:1 versetzt (Beispiel: 100 μ M CLA + 25 μ M BSA) und dann ins Versuchmedium gegeben. Alle Zelllinien wurden 3 Tage mit den Fettsäuren inkubiert. Zum Messen der Proliferationsrate wurden 20 μ l des Lösungsreagenz (Promega) in jedes Well pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation der 96-Well Platten bei 37 °C für 4 h im Brutschrank wurde der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 490 nm im Dynatech MR5000, Dynatech Laboratories, gemessen. Als Leerwert diente das Lösungsreagenz in normalem Medium ohne Zellen. Für jede Probe wurde eine 5fach Bestimmung durchgeführt. Nach Abzug des Leerwertes wurden die unbehandelten Zellen als 100 % Wachstum definiert und alle anderen Proben auf diesen Wert bezogen. Für alle Berechnungen wurde die Software Microsoft® Excel 97 benutzt. Alle Graphiken wurden mit SigmaPlot™9.0 erstellt (siehe auch Statistik Abschnitt 5.10).

5.6 Methoden zur Bestimmung der Differenzierung

5.6.1 Kultivierung der Caco-2 Zellen zur anschließenden Bestimmung des Differenzierungszustandes

Dieser Versuch diente dazu festzustellen, ob und wie die Testsubstanzen den Differenzierungszustand von Caco-2 Zellen beeinflussen können. Ein Marker für die Differenzierung in dieser Zelllinie ist die Intestinale Alkalische Phosphatase (IAP) [Matsumoto et al., 1990], ein Enzym, das sich während der Ausdifferenzierung in der Bürstensaummembran der Zelle einlagert. Hierzu wurden 80 % konfluente Caco-2 Zellen 1:5 in 75 cm² Kulturflaschen überführt und in DMEM + 10 % FKS über Nacht im Brutschrank inkubiert, damit sich die Zellen am Flaschenboden anheften konnten. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch serumfreies Medium mit 1 % ITS ersetzt. Alle Medienwechsel und Zellinduktionen wurden ab diesem Zeitpunkt ausschließlich mit serumfreiem Medium durchgeführt. Der Tag der Konfluenz wurde mit t_0 bezeichnet. Ab diesem Tag wurden die Caco-2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen behandelt. Die Verdünnungen der Fettsäuren wurden mit den gleichen Zusätzen, wie in Abschnitt 5.5.3 beschrieben, angesetzt. Die Inkubation der Zellen mit den Substanzen dauerte 7 Tage, wobei ein Medienwechsel alle 2 Tage wiederholt wurde.

5.6.2 Präparation der Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen nach SCHMITZ (modifiziert)

Bei der Präparation der Bürstensaummembran nach Schmitz (1973) handelt es sich um eine Fällungsreaktion, bei der die unterschiedlichen Ladungen der verschiedenen Zellbestandteile genutzt werden, um diese an zweiwertige Kationen zu binden und sie somit trennen zu können. Alle benötigten Reagenzien wurden vor Gebrauch gekühlt und alle Arbeiten auf Eis durchgeführt, um eine Beeinflussung und einen eventuellen Abbau der Intestinalen Alkalischen Phosphatase so gering wie möglich zu halten.

Der 7 Tage alte Caco-2 Monolayer wurde 3x mit Tris-Mannitol-Puffer gewaschen, um alle Rückstände der Fettsäuren und des Mediums zu entfernen.

Tris-Mannitol-Puffer

9,1 g/l D-Mannitol

1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung (121,14g/l Tris-HCl, pH 8,0)
pH 7,1 einstellen

Auf den Zellrasen wurde 1 ml des Puffers gegeben und dieser anschließend vorsichtig mit einem Gummi-Zellschaber vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators (Bandelin Sonoplus mit Sonotrode UW 2070; Einstellung: Pulszyklus 0,5 / Power 45 % / 2 min) auf Eis aufgeschlossen. Von diesem Homogenat wurden 1,35 ml in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 150 µl 0,1 M CaCl₂-Lösung verdünnt und 5x alle 2 min umgeschüttelt. Dieser Vorgang wurde 10 min lang wiederholt. Weitere 10 µl des Homogenats wurden mit 990 µl PBS verdünnt und bis zur Proteinbestimmung im Kühlschrank aufbewahrt [PH]. Die CaCl₂-gefällte Suspension wurde nach der Inkubationszeit für 10 min bei 2000x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falconröhrchen überführt und das die gefällten Zelltrümmer enthaltende Pellet verworfen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 30 min bei 33500x g und 4 °C. Nun wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet in 750 µl MilliQ-H₂O aufgenommen, mit Hilfe einer Pipette resuspendiert und auf Eis gestellt. 500 µl dieses Homogenats wurden mit 500 µl Tris-HCl-Puffer versetzt und für den Enzymaktivitätstest verwendet.

Tris-HCl-Puffer (1 M)

121,14 g/l Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 8,0

Weitere 100 µl des Homogenats wurden mit 900 µl PBS verdünnt und neben den bereits genommenen Proben für die zweite Proteinbestimmung eingesetzt [PM].

5.6.3 Proteinbestimmung nach Smith et al (1985)

Die Proteinbestimmung nach Smith beruht auf dem Prinzip, dass zweiwertiges Kupfer, sowohl von den Peptidbindungen der Proteine als auch von den Aminosäureresten des Cysteins, Tryptophans und des Tyrosins zu einwertigem Kupfer reduziert wird. Die in der Reaktionslösung eingesetzte Bicinchoninsäure-Lösung bildet mit dem reduzierten Kupfer einen violetten Farbkomplex, welcher photometrisch bestimmt werden kann.

Zuerst wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte 100 µl PBS als Leerwert und eine Eichreihe aus je 100 µl Lösungen bestimmter Konzentrationen (10 µg/ml–100 µg/ml) bovinen Serumalbumins in PBS pipettiert. Nun wurden je 100 µl der gewonnenen Proben aus der Membranpräparation in die verschiedenen Wells der Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl der frisch angesetzten Kupfer-(II)-Sulfat/Bicinchoninsäure-Lösung zu den jeweiligen Proben und den Standardlösungen zugegeben.

Smith-Reagenz

4 % Kupfer-(II)-sulfat-Lösung
Bicinchoninsäure-Lösung
Verhältnis 1:50 (v/v)

Die Mikrotiterplatte wurde mit einem Deckel verschlossen und für 45 min bei 60 °C inkubiert. Die anschließende photometrische Messung erfolgte in einem Anthos LUCY2 Plattenreader bei 550 nm. Alle Messungen, sowohl die der Proben als auch die der Standards, wurden als Doppelproben durchgeführt. Die Aufnahme der Extinktionswerte erfolgte über die Software MikroWin3.0 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath) und die Auswertung mit Hilfe der Software Microsoft® Excel 97. Anhand der Standardkurve konnten die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet werden.

5.6.4 Enzymtest zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase als Marker für das Differenzierungsstadium von Caco-2 Zellen

Diese Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität nutzt die Fähigkeit der Phosphatase, das farblose Substrat p-Nitrophenylphosphat durch Hydrolyse in p-Nitrophenol umzusetzen. Hierbei entsteht ein Farbumschlag von farblos nach gelb, welcher sich photometrisch bei 405 nm gegen eine Eichreihe messen lässt. In einer wässrigen Lösung, die durch den eingesetzten Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) leicht alkalisch wird, und einer Substratkonzentration von mindestens 0,1 mg/ml ist die Enzymaktivität bei Raumtemperatur direkt proportional zur Enzymkonzentration (nach Garen und Levinthal, 1960).

Auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 150 µl Tris-HCl-Puffer als Leerwert und eine Eichreihe mit je 250 µl p-Nitrophenol-Standardlösungen bekannter Konzentrationen (20 µM – 80 µM) vorgelegt. Die zu testenden Proben für den Aktivitätstest wurden mit jeweils 150 µl als Doppelprobe vorgelegt. Nun wurden pro Well 100 µl des frisch angesetzten Assay-Reagenz zügig zu dem Leerwert und den Proben pipettiert und unverzüglich die Messung vorgenommen, da die Reaktion des Substrats mit der Probe unmittelbar nach Zugabe beginnt.

Assay-Reagenz

0,8 mg/ml	p-Nitrophenyl-phosphat in
1 M	Tris-HCl-Puffer, pH 8,0

Die Messungen erfolgten an einem Anthos LUCY2 Luminometer bei 405 nm im Intervall von 90 sec für die Dauer von 15 min. Die erhaltenen Kinetikdaten wurden mit Hilfe des Programms MikroWin3.0 aufgezeichnet und die Enzymaktivität U ausgerechnet. Weitere Auswertungen erfolgten mit der Software Microsoft® Excel 97.

5.6.5 Schritte zur Berechnung der spezifischen Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatas

Um die spezifische Aktivität [U/mg Protein] berechnen zu können, musste zuerst die Aktivität [U] aus dem Enzymassay und der Proteingehalt der Membransuspension [PM] errechnet werden. Die Aktivität wurde dann mit dem Proteingehalt in Beziehung gesetzt und so die spezifische Aktivität des Enzyms jeder einzelnen Probe in U/mg Protein ausgedrückt.

PH	Proteingehalt des Homogenates am Anfang der Präparation
PM	Proteingehalt am Ende der Präparation
U	Enzymaktivität [μ M umgesetzt Substrat/min]
V	tatsächlich eingesetztes Volumen
VF	Verdünnungsfaktor aus der Membranpräparation

Berechnung der Aktivität [U]:

Aus der Geradengleichung $y = mx+b$ ergibt sich $x = (y-b)/m$, wobei x die Aktivität [U] bezeichnet.

y	E (Extinktion aus Enzymassay)
b	Achsenabschnitt
m	Steigung der Geraden aus Enzymassay
x	Enzymaktivität [U]

Berechnung der Aufreinigungsrate der Membranpräparation:

$$\text{Aufreinigungsrate [\%]} = \frac{\text{PM [mg/ml]} * \text{VF} * 100}{\text{PH [mg/ml]}}$$

Berechnung der Spezifischen Aktivität:

$$\text{Spezifische Aktivität [U / mg Protein]} = \frac{\text{Aktivität [U]}}{\text{PM [mg/ml]} * \text{V [ml]} * \text{VF}}$$

5.7 Studien zur Zytotoxizität und Apoptose

5.7.1 Neutralrot-Test

Die Daten der Zytotoxizitätsbestimmungen sollten klären, ob die Effekte der Testsubstanzen in den einzelnen Versuchen aufgrund ihrer für die Zelllinien toxischen Wirkungen erzeugt wurden oder ob es tatsächlich spezifische Effekte auf molekularen Ebenen waren. Hierzu wurde sich des Neutralrot-Tests bedient. Nach Behandlung der Zellen mit einer in Medium verdünnten Neutralrot-Lösung nehmen alle lebenden Zellen den Farbstoff in ihre Lysosomen auf, während tote Zellen dieses nicht mehr können. Alle Zelllinien wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Proliferationsassay (Abschnitt 5.5.3) in 96-Well Platten ausgesät, inkubiert und mit den Testsubstanzen behandelt. Nach einer Induktion von 3 Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 µl/Well Neutralrot-Gebrauchslösung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. 3 h später wurden alle Zellen mindestens 2x mit je 100 µl/Well PBS gewaschen. Eine Zugabe von 200 µl/Well essigsaurer Ethanollösung diente zur Farbentwicklung.

Neutralrot-Stocklösung

0,4 % Neutralrot in dest. H₂O lösen (0,04 g/10 ml)
sterilfiltrieren

Neutralrot-Gebrauchslösung

Stocklösung 1:80 in DME-Medium lösen
10 min bei 2500 rpm zentrifugieren und obere Hälfte für Test einsetzen
immer frisch ansetzen

Extraktionslösung

50 % Ethanol abs.
49 % dest. H₂O
1 % Eisessig

Nach einer Inkubation von 15 min auf dem Rüttler war die Homogenität der Farbe in den Wells erreicht, und die Platte konnte bei 540 nm photometrisch (Anthos LUCY2) gemessen werden. Alle Proben wurden in 8 Replikaten angesetzt. Die Werte der unbehandelten Zellen wurden als 0 % Cytotoxizität (oder 100 % Wachstum) bezeichnet und die mit Substanzen behandelten Zellproben daran angeglichen. Für die Auswertungen wurde die Software Microsoft® Excel 97 verwendet.

5.7.2 Acridin Orange-Färbung zur mikroskopischen Bestimmung des Apoptosestadiums mit Fettsäure behandelte Caco-2 wt Zellen und stabiler Caco-2 Klone

Zur optischen Erkennung des Apoptosestadiums behandelte Zellen wurde die Acridin Orange-Färbung durchgeführt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennt man anschließend gesunde Zellen an ihrem ovalen Kern und ihrer Adhärenz. Weiterhin liegen diese meist nicht in dem selben Fokus der apoptotischen Zellen und wirken daher ein wenig unscharf und schwachgefärbt. Zellen, die in der Apoptose begriffen sind, runden sich stark ab, und es ist eine klare, konzentrierte Acridin-Färbung des Chromatins im Kern zu erkennen.

Für diesen Versuch wurden zuerst Deckgläschen für mindestens 30 min in Ethanol sterilisiert und anschließend mehrfach gründlich mit PBS gewaschen. Dann wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette auf 6-Well Platten verteilt. Die Aussaat der verschiedenen Caco-2 Zelltypen erfolgte mit 2×10^5 Zellen pro Well. Zum Anheften der Zellen wurden sie über Nacht in normalem Kulturmedium + 10 % FKS inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Umstellung des Mediums und die Induktion der Zellen nach dem Prinzip des Proliferationsassays (Abschnitt 5.5.3). Nach 4 Tagen wurden die Deckgläschen mit den darauf gewachsenen Zellen für 5 min in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend für mindestens 10 min in PBS rehydriert. Eine Färbung der Zellen mit einer Acridin Orange-Lösung (Sigma) von 10 µg/ml in PBS wurde durchgeführt. Um die überschüssige Farbe zu entfernen, wurden die Deckgläschen am Ende noch einmal kurz mit PBS gespült. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abs 440-480 nm, Em 520-650 nm) wurden dann die gefärbten Zellen ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde ermittelt und die davon apoptotischen Zellen prozentual berechnet. Alle Graphiken wurden mit der Software SigmaPlot 9.0 erstellt.

5.7.3 Kolorimetrische Bestimmung der Caspase-3 Aktivität als Apoptosemarker

Caspasen sind Proteasen (**Cystein-abhängige Aspartat Proteasen**), die im Rahmen der Apoptose von der inaktiven Pro-Caspase, bestehend aus einer Prodomäne, einer großen Untereinheit und einer kleinen Untereinheit, die abgespalten werden muss, in die aktive Form überführt werden. Nach einer Initialzündung aktivieren aktive Caspasen andere Caspasen. Caspase-3 gehört zu der ICE-Familie der Cystein-Proteasen (interleukin-1 β converting enzyme family). Dieses Enzym wird von Proteasen, einschließlich Caspase-6, Caspase-8 und Granzym B, während des Apoptose-Signalweges aktiviert. Für diesen Versuch wurde ein Caspase-3 Substrat I (Calbiochem, 235400) verwendet. Mit diesem Substrat kann die Induktion der Caspase-3 Aktivität in apoptotischen Zellen kolorimetrisch gemessen werden.

Die Caco-2 Zelltypen wurden hierfür mit 2×10^6 Zellen pro 75 cm² Kulturflasche ausgesät und über Nacht in normalem Kulturmedium + 10 % FKS inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Zellen nach dem Schema des Proliferationsassays (Abschnitt 5.5.3) mit verschiedenen Konzentrationen der 10E,12Z-CLA induziert. Als Positivkontrolle diente das Tumortherapeutikum Camptothecin in einer Konzentration von 50 μ M. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und gezählt (Abschnitt 5.1.4). Die Zellen wurden auf $10^6/50$ μ l Lysispuffer eingestellt, gründlich resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert.

<u>Lysis-Puffer</u>		<u>Assay-Puffer</u>	
50 mM	HEPES, pH 7,4	50 mM	HEPES, pH 7,4
100 mM	NaCl	100 mM	NaCl
0,1 %	CHAPS	0,1 %	CHAPS
1 mM	DTT	10 mM	DTT
0,1 mM	EDTA	0,1 mM	EDTA
		10 %	Glycerol

Es folgte eine Zentrifugation bei 10 000x g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand (Cytosolfraktion) wurde abgenommen und bis zur Messung auf Eis gestellt. Nun wurde eine 100 mM Caspase-3-Substrat I Lösung (Calbiochem, 235400) in DMSO angesetzt und anschließend 1:50 in Assay-Puffer verdünnt. Die entstandene Gebrauchslösung hatte somit eine Konzentration von 2 mM.

In einem anderen Ansatz wurde eine 100 mM Caspase-3 Inhibitor I (Calbiochem, 235420) Lösung in DMSO hergestellt. Davon wurde eine 1:1000 Verdünnung in Assay-Puffer angesetzt und 5 µl dieser Verdünnung pro 1 ml Assay-Puffer (Endkonzentration 500 nM) als Gebrauchslösung verwendet. Für die Assaydurchführung wurde zunächst der Assay-Puffer in die Wells einer 96-Well Platte pipettiert und die Platte für 10 min bei 37 °C equilibriert. Anschließend wurde der Zellextrakt hinzugegeben, gefolgt von der Caspase-3 Inhibitor I Gebrauchslösung. Der Inhibitor hatte am Ende in den entsprechenden Wells eine Konzentration von 100 nM. Um die Enzym-Inhibitor-Interaktion zu gewährleisten, wurde die 96-Well Platte für 10 min bei Assaytemperatur vorinkubiert. Zum Schluss wurde die Reaktion durch Zugabe der Caspase-3 Substrat I Gebrauchslösung gestartet. Die Substrat-Endkonzentration in jedem Well betrug 200 µM.

Tabelle 5-4: Pipettierschema für die Bestimmung der Caspase-3 Aktivität.

	Assay Puffer	Zellextrakt	Inhibitor (500 nM)	Substrat (2 mM)
Blank	90 µl	0	0	10 µl
Zellextrakt	80 µl	10 µl	0	10 µl
Inhibitor-behandelter Zellextrakt	60 µl	10 µl	20 µl	10 µl

Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2-4 Stunden bei 37 °C wurde die Caspase-3 Aktivität bei einer Absorption von 405 nm in einem Anthos LUCY2 Plattenreader gemessen. Alle Proben wurden mindestens als Doppelbestimmung angesetzt. Die Aufnahme der Extinktionswerte erfolgte über die Software MikroWin 3.0 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath). Weitere Auswertungen wurden mit der Software Microsoft® Excel 97 durchgeführt. Beim Vergleich der Werte der Zellextrakte mit den entsprechenden Werten der Inhibitor-behandelten Zellextrakte konnte die unspezifische Hydrolyse des Caspase-3 Substrat I ermittelt werden. Unbehandelte Zellproben wurden als 0 % Caspase-3 Aktivität bezeichnet und alle anderen Werte daran angeglichen.

5.8 Studien zur Genexpression

5.8.1 Gesamt-RNA-Präparation nach Chomczynski & Sacchi

Die RNA-Extraktion wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt und beruht auf der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Für das Arbeiten mit RNA wurden sämtliche Puffer und Lösungen mit DEPC-H₂O angesetzt und immer auf Eis gearbeitet.

DEPC-H₂O

1 ml DEPC auf 1 l H₂O demin. (1⁰/₀₀)
2 h rühren, autoklavieren

Für die Genexpressionsanalysen wurden alle Zellen in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ pro 250 ml Kulturflasche ausgesät und direkt bei Aussaat mit den Testsubstanzen konzentrationsabhängig behandelt. Alle Versuche wurden mindestens 3x angesetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach verschiedenen Zeitpunkten und wird im Ergebnisteil gesondert erwähnt. Nach Verwerfen des Mediums wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und je 2 ml GTC-Lösung pro Zellkulturflasche zugegeben.

GTC-Lösung

50 g Guanidinthiocyanat in 50 ml MilliQ-H₂O bei 40 °C im Schüttelbad lösen
2,5 ml 1 M Na-Citrat (29,41 g Trinatrium-dihydrat in 100 ml H₂O)
2,5 ml 20 %ige Na-Lauroyl-Sarcosin-Lösung
auf 100 ml mit MilliQ-H₂O auffüllen, sterilfiltrieren

Die abgelösten Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 2 ml Spritze mit Kanüle (0,9 x 40 mm, 20G) lysiert und die darin enthaltene DNA auf diese Weise geschert. Zu dem Homogenat wurden 400 µl Na-Acetat-Lösung (2 M, pH 4,0), 2 ml wassergesättigtes Phenol und 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1, v/v) zugegeben. Das Gemisch wurde 30 sec gevortext und für 15 min auf Eis gekühlt. Durch die Zugabe von angesäuertem Phenol werden die Proteine denaturiert, der pH-Wert gesenkt und die kleineren DNA-Fragmente in dem Phenol gelöst. Das Chloroform verstärkt die Ausfällung der Proteine und unterstützte zusätzlich die Phasentrennung zwischen der wässrigen RNA-Lösung und der Phenolphase. Der Anteil der wässrigen Phase, der sich in der phenolischen Phase löst, wird dadurch

reduziert und so die Ausbeute an Nucleinsäuren erhöht. Der Alkohol soll ein zu starkes Aufschäumen der Probe während des Mischvorganges verhindern.

Die Proben wurde anschließend für 30 min bei 10 000 rpm zentrifugiert (Beckmann, Avanti J-25 I). Daraus resultierend bildeten sich 3 Phasen, wobei die obere wässrige Phase die gelösten RNA-Moleküle enthielt. In der weißlichen Interphase waren die denaturierten Proteine zu finden, und in der unteren phenolischen Phase war die gelöste DNA. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit einem ebenso großen Volumen Isopropanol versetzt. Es erfolgte eine Fällung der RNA über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Am nächsten Tag wurde die Lösung bei 10 000 rpm für 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde zur besseren Aufreinigung einer weiteren Lyse mit GTC-Lösung und einer erneuten Alkoholfällung für 3 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unterzogen. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 10 000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Beckmann, Mikrofuge[®] R) wurde das Pellet mit 500 μl 70 %igem Ethanol gewaschen und in einer Speedvac (Eppendorf, Concentrator 5301) getrocknet. Je nach Ausbeute wurde das Pellet in bis zu 200 μl DEPC-H₂O aufgenommen.

5.8.2 RNA-Präparation mit Trizol

Für die Präparation der RNA aus Caco-2 wt Zellen und Klonen wurden diese in 6-Well Platten mit einer Konzentration von 400 000 Zellen/Well ausgesät und direkt mit den Testsubstanzen behandelt. Pro Konzentration, Substanz und Zeitpunkt wurden je 3 Parallelproben angesetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach verschiedenen Zeitpunkten, die später im Ergebnisteil erläutert werden. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die jeweils 3 Parallelproben wurden zusammen in 500 μl Trizol-Reagenz aufgenommen (1 ml Trizol pro 1×10^7 Zellen), resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min. Der Überstand wurde mit 100 μl Chloroform versetzt und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min bei 12000x g erneut zentrifugiert. Die RNA in der wässrigen Phase konnte nun mit 250 μl Isopropanol präzipitiert werden. Nach einer erneuten Zentrifugation (12000x g, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde das RNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 50-100 μl DEPC-H₂O aufgenommen.

5.8.3 Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der RNA

Zur RNA-Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot mit DEPC-H₂O 1:100 verdünnt und in einer Mikroküvette gegen DEPC-H₂O als Leerwert gemessen. Die Messungen wurden in einem UV-VIS Spektrometer Lambda Bio 20 (Perkin Elmer, Überlingen) bei 260 nm und 280 nm durchgeführt. Ein geräteinternes Programm errechnet aus diesen beiden Extinktionen einen Quotienten, der auf die Reinheit der präparierten RNA schließen lässt. Hierbei galten Quotienten > 1,7 als sehr rein, Quotienten von 1,8-2,0 als proteinfrei (nach MÜLHARDT 2000). RNA-Proben mit einer Ratio ab 1,5 wurden für Genexpressionsstudien verwendet. Die Konzentration einer Probe ließ sich anhand der Extinktion bei 260 nm berechnen. Hierbei wurde eine Extinktion von 1 OD einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml RNA gleichgesetzt. Berücksichtigt werden musste ebenfalls der Verdünnungsfaktor von 100.

$$\text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 = \text{Konzentration ng/}\mu\text{l bzw. }\mu\text{g/ml}$$

Abbildung 5-2: Formel zur Berechnung von RNA-Konzentrationen.

5.8.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

Die RNA-Qualität kann anhand einer analytischen Auftrennung der RNA/DNA-Fragmente mittels horizontaler Gelelektrophorese in 1 %igen Agarose-Gelen überprüft werden. Bei der Elektrophorese erfolgt die Auftrennung der Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung. Die Moleküle wandern dementsprechend in einem elektrischen Feld immer zur Anode. Durch die Matrix des Gels werden große Moleküle aufgehalten, während sich kleine Moleküle schneller durch das Gel bewegen können. Nach diesem Prinzip erhält man eine Auftrennung der RNA oder DNA nach ihren Fragmentgrößen. Die Gesamt-RNA aus den Präparationen wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese auf ihre Reinheit überprüft. Die Auftrennung erfolgte durch ein 1 %iges (w/v) RNA-Agarosegel in 1x MOPS-Puffer mit 5 % Formaldehyd zur Denaturierung von Fremdproteinen.

MOPS-Puffer (10x)

41,854 g 3-Morpholino-1-propansulfonsäure
 4,102 g Natriumacetat
 20 ml EDTA (0,5 M)
 in 1 l DEPC-H₂O lösen

RNA-Gel (1%)

1 g RNA-Agarose
 10 ml MOPS 10x
 85 ml DEPC-H₂O
 5 ml Formaldehyd

RNA-Auftragspuffer

0,01 % Bromphenolblau
 0,01 % Xylencyanol
 20 mM EDTA
 in Formamid + 0,01 % EtBr

Jeweils 2-5 µg RNA wurden mit 3 µl ethidiumbromidhaltigem RNA-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 65 °C in einem Heizblock (BIOMETRA, TBI Thermoblock, Göttingen) denaturiert, danach auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde in einer Flachbett-Elektrophoreseapparatur (Life Technologies, Horizon 1114 mit Spannungsquelle BIOMETRA Power Pack P25) bei 100 V und einer Dauer von ca. 1,5 h durchgeführt. Die visuelle Beurteilung der RNA erfolgte mittels einer UV-Lampe (254 nm), die das Ethidiumbromid in dem Auftragspuffer anregte und auf diese Weise die RNA sichtbar machte. Zur Dokumentation wurden die Gele mit Hilfe einer CCD-Kamera fotografiert und als Datei gespeichert (BioRad, GelDoc1000 mit Molecular Analyst-Software V. 1.4, Hercules, CA, USA).

5.8.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Aus den verschiedenen behandelten Zelllinien wurde nach zwei Methoden RNA isoliert. Die RNA musste nun nach dem Prinzip der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die sogenannte cDNA-Synthese wurde gemäß der Methode von GUBLER und HOFFMANN (1983) durchgeführt. Hierbei wurde am Poly-A-Schwanz der Proben-mRNA ein Olig(dT)-Primer hybridisiert, an dem dann die cDNA in 3'-5'-Richtung synthetisiert wurde. Der Prozess wurde durch das Enzym SuperScript™ II RNase H Reverse Transkriptase katalysiert, welches die Nukleotide zu einem komplementären Strang miteinander verband. Ein Inhibitor verhinderte zusätzlich den Abbau der RNA durch RNAsen.

Die cDNA-Synthese umfasst immer zwei Schritte. Im ersten wird der Oligo-(dT)-Primer am Poly-A⁺-Schwanz der mRNA hybridisiert. Dies erfolgte pro Probe in einem Ansatz von 20 µl Gesamtvolumen für 10 min bei 72 °C in einem Heizblock.

Schritt 1	1 µg	Proben-RNA
	3 µl	Oligo-(dT)-Primer (0,5 µg/µl)
	1 µl	RNase-Inhibitor
	x µl	DEPC-H ₂ O
	<hr/>	
	10 µl	Gesamtvolumen

Im zweiten Schritt muss die mRNA sofort mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Die Durchführung erfolgte in einem Gesamtvolumenansatz von 20 µl pro Probe bei 42 °C für 2 h.

Schritt 2	10 µl	Hybridisierungsansatz aus Schritt 1
	6 µl	Superscript-Puffer (5x)
	1 µl	SuperScript™ II RNase H Reverse Transkriptase
	2 µl	dNTP's (10 mM)
	1 µl	dH ₂ O
	<hr/>	
	20 µl	Gesamtvolumen

Die cDNA wurde anschließend für diverse Genexpressionsversuche in der Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) eingesetzt. Für eine längere Aufbewahrung wurde die cDNA bei -80 °C eingefroren.

5.8.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR): Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Oligonukleotiden

Bei der PCR nutzt man die Eigenschaften von DNA-Polymerasen aus, an einem Einzelstrang einen komplementären Strang synthetisieren zu können. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die sogenannten Primer, erkennen die Randbereiche der zu amplifizierenden Sequenz, und die DNA-Polymerase synthetisiert im Anschluss den komplementären Strang zwischen diesen Bereichen. Bei Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Auffüllreaktion kommt es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz. Eine Amplifizierung gesuchter DNA-Abschnitte erfolgte in einem programmierbaren Temperaturblock (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600, Norwalk, CT, USA). Die in Abschnitt 5.8.5 gewonnene cDNA wurde bei dieser Reaktion als Template eingesetzt. Die Konzentration der einzelnen Templates richtete sich nach der optimierten cDNA-Menge, die durch eine *β-actin* PCR vorher bestimmt wurde. *β-actin* ist ein sogenanntes „housekeeping“ Gen, welches in den Zelllinien konstitutiv exprimiert wird und hier immer als Standard diente. Bei jeder PCR-Reaktion wurde nur ein Zielgen untersucht und somit auch immer nur ein Primerpaar eingesetzt. Alle Primer wurden mit Hilfe des Programms DNASIS für Windows (Version 2.1, Hitachi Software Engineering) entworfen. Desweiteren wurde bei der Auswahl der Primer auf einen GC-Gehalt von 40–60 %, einer möglichst gleichmäßigen „Annealing“-Temperatur und auf eine Länge von nicht mehr als 300–400 Basen des Amplikons geachtet.

Für einen Gesamtansatz von 25 µl wurden pro Probe und Gen die folgenden Komponenten zusammenpipettiert:

X µl	Template (je nach Optimierung)
X µl	DEPC-H ₂ O (je nach Optimierung des Templates)
2,5 µl	10x PCR-Puffer
2,5 µl	dNTP's (2 mM)
0,625 µl	Sense-Primer (25 mM)
0,625 µl	Antisense-Primer (25 mM)
0,1µl	Taq-Polymerase (1000 U/µl)

Eine nun folgende PCR-Reaktion setzte sich aus den drei folgenden Segmenten zusammen:

1. Segment Initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 min
2. Segment a) Denaturierungsphase zur Aufhebung der Helixstruktur für 30 sec bei 95 °C
 b) Annealingphase für 30 sec bei 57-60 °C (primerspezifisch, Tabelle 5-5) in der sich die Oligonucleotide an komplementäre DNA-Sequenzen anlagern
 c) Elongationsphase für 30 sec bei 72 °C in der die Taq-Polymerase in 3'-Richtung von den Primern ausgehend neue zur DNA komplementäre Nucleotide anfügt
3. Segment Endzyklus von 10 min bei 72 °C und anschließende Kühlung der Proben bei 4 °C

Das komplette 2. Segment einer derartigen PCR-Reaktion wiederholte sich für mehrere Zyklen. Die Anzahl der Zyklen war abhängig von dem gesuchten Gen. Wurde es stark exprimiert, sank die Zyklenzahl gegenüber der von schwach exprimierten Genen. In Tabelle 5-5 sind alle wichtigen Informationen der untersuchten Gene mit ihren PCR-Bedingungen nachzulesen.

Tabelle 5-5: Gesamtübersicht aller untersuchten Gene.

Codiertes Protein	Annealingtemperatur	Zyklen
β-actin	57°C	28
c-myc	63°C	30
cyclin D1	58°C	30
c-jun	60°C	30
β-catenin	60°C	30
hPPARδ	53°C	30

Am Anschluss an eine PCR-Reaktion wurden die amplifizierten DNA-Fragmente für die Gelelektrophorese eingesetzt.

5.8.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die Visualisierung der in der PCR-Reaktion entstandenen DNA-Fragmente wurden jeweils 10 µl von jeder Probe auf ein 1,5 % Agarosegel in 1x TBE aufgetragen, die vorher mit 4 µl Auftragspuffer GMM (40 % Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xyclencyanolblau) versetzt wurden. Vor dem Gießen wurde dem noch flüssigen Agarosegel 2 µl des interkalierenden Farbstoffs Ethidium-Bromid (EtBr) zugegeben. Dies diente zur späteren Darstellung der DNA-Banden unter UV-Licht (254 nm). Die Auftrennung der Proben wurde in einer Flachbett-Elektrophoreseapparatur bei einer Spannung von 100 V und einer Laufzeit von ca. 1,5 h durchgeführt. Als Molekulargewichtstandard wurde ein „100 bp-DNA-Ladder“ aufgetragen. Alle Gele wurden am Ende mit einer CCD-Kamera einer Gel Doc 1000[®] Anlage (BioRad, München) fotografiert. Die einzelnen Banden der verschiedenen Konzentrations- und Zeitparameter wurden mit Hilfe des Programms Molecular Analyst-Software V. 1.4[®] (BioRad, München) densitometrisch berechnet und so die unterschiedliche Expression der Gene ausgewertet.

5.8.8 Densitometrische Auswertung

Die Auswertung der Genexpressionsstudien erfolgte mit Hilfe des Programms Molecular Analyst[®] von BioRad. Hierbei wurden die DNA-Banden-Signale einer digitalen Aufnahme des entsprechenden Gels in eine Pixel-Zahl umgerechnet (counts). Alle Banden wurden mit einem konstant großen rechteckigen Auswertebereich umschlossen (volume). Auf diese Weise erhielt man für jede Bande die entsprechenden Pixel pro Flächeneinheit (volume counts x mm²). Nach Abzug der Pixelwerte für den Hintergrund (Anzahl der Pixel in einem Auswertebereich ohne Bande) erhielt man die Endergebnisse, die in diesem Programm als Mean counts bezeichnet wurden. Für die Auswertung wurden die Mean counts in die Software Microsoft[®] Excel 97 übertragen. Für eine ganz genaue Auswertung der einzelnen Genexpressionen wurde am Ende der Quotient aus dem gesuchten Gen und der der Probe entsprechenden *β-actin*-Expression gebildet. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche wurden also immer durch ihr eigenes *β-actin*-Profil normalisiert und konnten so miteinander verglichen werden.

5.9 Proteinbiochemische Studien

5.9.1 Zellkulturbedingungen für Proteinnachweise im Western Blot

Alle Zelllinien für die Proteinnachweise wurden mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 75 cm^2 Kulturflasche ausgesät und direkt mit den Testsubstanzen konzentrationsabhängig behandelt. Jeder Zeit- und Konzentrationspunkt wurde als Doppelprobe angesetzt. Die Zellernte erfolgte nach 24 h, 48 h und 96 h Inkubationszeit bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank unter normalen Wachstumsbedingungen. Hierbei wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mittels eines Gummi-Schabers geerntet. Anschließend wurden sie in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und kurz abzentrifugiert. Das Pellet konnte bis zum Gebrauch bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

5.9.2 Cytosolpräparation

Das Zellpellet aus Abschnitt 5.9.1 wurde mit $500 \text{ } \mu\text{l}$ Gentle-Lysis-Puffer + Proteaseinhibitoren resuspendiert, homogenisiert und bei $7000 \times g$ für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert.

<u>Gentle-Lysis-Puffer</u>		<u>Proteaseinhibitoren</u>	
25 mM	Tris, pH 7,4	1 mg/ml	Leupeptin
1 %	NP-40	10 ng/ml	Aprotenin
10 %	Glycerin	1 mM	PMSF
50 mM	NaF	1 mM	Na_3VO_4
10 mM	Na_2HPO_4		
137 mM	NaCl		

Im Überstand befand sich nun das Cytosol. Um die Konzentration aller Proben für die SDS-Page anzugleichen, erfolgte eine Proteinbestimmung wie in Abschnitt 5.6.3 beschrieben.

5.9.3 Kernextraktion

Das Zellpellet aus Abschnitt 5.9.2 wurde mit 1,5 ml hypotonem Lysispuffer + Proteaseinhibitoren resuspendiert und für 30 min auf Eis zum Quellen inkubiert.

Hypotoner Lysispuffer

10 mM	Tris, pH 7,5
10 mM	NaCl
3 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
0,5 %	NP-40

RIPA-Puffer

20 mM	Tris, pH 7,4
25 mM	EDTA
1 %	Triton X-100
10 %	Glycerin
0,1 %	SDS
50 mM	NaF
10 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
1 %	Desoxycholat

Proteaseinhibitoren siehe Cytosolpräparation (Abschnitt 5.9.2).

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 7000x g (4 °C). Das entstandene Pellet wurde mit 500 µl RIPA-Puffer erneut lysiert, gevortext und bei 13000x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die Zellkerne. Im Anschluss an die Kernextraktion wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben bestimmt (Abschnitt 5.6.3).

5.9.4 Gesamtzelllysat

Die Zellpellets aus Abschnitt 5.9.1 wurden mit 100 µl Lysispuffer + Proteaseinhibitoren resuspendiert, homogenisiert und für 20 min auf Eis zum Quellen inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 6 min bei 15 000x g und 4 °C. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und stellte das Gesamtzelllysat dar. Nach einer Konzentrationsbestimmung der Proteine (Abschnitt 5.6.3) wurden pro Probe 30 µg Protein im SDS-Gel aufgetrennt.

Lysispuffer

50 mM	Tris, pH 7,4
0,25 %	Na-desoxycholat
150 mM	NaCl
1 mM	EGTA
1 mM	NaF
1 %	NP-40

Proteaseinhibitoren siehe Cytosolpräparation (Abschnitt 5.9.2).

5.9.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden die isolierten Proteine aus Abschnitt 5.9.3 und 5.9.4 ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür wurden seifenfreie getrocknete Glasplatten mit Spacern zusammengebaut und festgeklemmt. Nun wurden die Komponenten des Trenngels (Tabelle 5-6) zusammenpipettiert und sofort bis zu $\frac{3}{4}$ (bei Minigelen ca. 6 cm) zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Zur besseren Bildung einer klaren Gelkante wurde das noch flüssige Trenngel mit Isopropanol vorsichtig überschichtet. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol abgezogen und mit dest. H₂O gespült. Im Anschluss daran konnte das frisch hergestellte Sammelgel (Tabelle 5-6) bis zur Oberkante der Glasplatten über das feste Trenngel gegeben werden. Sofort wurde der Kamm blasenfrei zwischen die Platten in das Sammelgel gesteckt. Inzwischen wurden die Proben mit definierter Proteinkonzentration (Kerne 5 µg, Gesamtzelllysat 30 µg) auf 10 µl mit PBS aufgefüllt, mit 5 µl 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das gebildete Kondenswasser wurde kurz abzentrifugiert. Nach 30 min wurde der Kamm aus dem Gel herausgezogen und die entstandenen Taschen mit dest. H₂O gespült, um eventuelle Gelreste zu entfernen. Das nun fertige SDS-Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gespannt, die Puffertanks mit Laufpuffer aufgefüllt und die vorbereiteten Proben vorsichtig mittels einer Hamelton-Spritze in die Taschen pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurden noch 5 µl eines Molekulargewichtsstandards als Marker aufgetragen. Das beladene Gel wurde nun bei 70 V gestartet und lief solange, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Anschließend wurde die Voltzahl auf 120-150 V konstant erhöht. Die Elektrophorese war beendet, wenn die blaue Lauffront bis 0,5 cm an die Unterkante der Glasplatten gelangt war. Das Netzgerät wurde ausgeschaltet, der Puffer abgegossen und die Glasplatten aus der Kammer entnommen. Die Spacer wurden entfernt und die Platten durch vorsichtiges Hebeln mit einem Spatel o.ä. voneinander getrennt. Die Laufrichtung und die Vorder- bzw. Hinterseite des Gels wurden ausreichend markiert.

Methoden

Tabelle 5-6: Komponenten des Trenn- und Sammelgels. Die Angaben beziehen sich auf das Volumen für 2 Mini-Gele.

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
Bidest. H ₂ O	4,9 ml	4,75 ml
Acrylamid 30/0,8	4 ml	0,7 ml
Trenngelpuffer	3 ml	
Sammelgelpuffer		625 µl
SDS (10 %)	120 µl	50 µl
TEMED	6 µl	5 µl
APS (10 %)	100 µl	40 µl

Trenngelpuffer

1,5 mM Tris, pH 8,8
(181,69 g/l)

Sammelgelpuffer

0,5 mM Tris, pH 6,8
(60,55 g/l)

Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS
Wichtig: kein pH einstellen
Soll: pH 8,3

2x Laemmli-Probenpuffer

125 mM Tris, pH 6,8
4 % SDS
20 % Glycerin
0,02 % Bromphenolblau
32 mM DTT direkt vor Gebrauch zusetzen

5.9.6 Western Blot

Für den Blot wurden 6 Whatman-Papiere in der entsprechenden Gelgröße in Vierecke geschnitten und einige Zeit in Transfer-Puffer getränkt. Die verwendete Nitrocellulosemembran wurde ebenfalls kurz durch den selben Puffer gezogen. Das Gel aus der Elektrophorese wurde für 15 min in Transfer-Puffer gelegt. Anschließend wurde ein Sandwich nach folgendem Schema zwischen die beiden Elektroden der Blot-Kammer zusammengesetzt.

Transfer-Puffer

25 mM Tris
 25 mM Glycin
 20 % Methanol
 Wichtig: pH nicht einstellen
 Soll automatisch: pH 8,3

Sandwichaufbau vom + zum - Pol

3x Whatman-Papier
 Nitrocellulosemembran
 vorbereitetes Gel
 3x Whatman-Papier

Die Blot-Kammer wurde geschlossen und das Gel bei 0,04 A für 50 min auf die Membran geblottet. Nach Beendigung des Blots wurde das Sandwich vorsichtig auseinandergebaut.

5.9.7 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen

Das geblottete Gel wurde für ca. 1 h in einer Coomassie-Blau-Färbelösung geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Entfärbung für 1 h im Entfärber I, gefolgt von dem Schwenken des Gels für eine weitere Stunde in dem Entfärber II. Der letzte Schritt konnte auch über Nacht durchgeführt werden.

Färbelösung

0,2 % Coomassie Blue R 250
 50 % Methanol
 10 % Essigsäure
 in H₂O

Entfärber I

50 % Methanol
 10 % Essigsäure
 in H₂O

Entfärber II

10 % Methanol
 5 % Essigsäure
 in H₂O

5.9.8 Vakuumtrocknung von SDS-Gelen

Nach der Coomassie-Blau-Färbung wurde das Gel auf ein trockenes Whatman-Papier gelegt und auf einem Vakuumtrockner für mindestens 2 h bei 80 °C getrocknet. Um ein Zerreißen des fertigen Gels zu verhindern, musste es vollständig ausgekühlt sein.

5.9.9 Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen

Zum Anfärben der Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurde die Ponceau S Lösung (Sigma) nach Herstellerangaben angesetzt und die Membran für 1 min darin geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Membran mit dest. H₂O gewaschen bis die geblotteten Proteine als rote Banden sichtbar wurden. Die zu erkennenden Markerbanden des Proteinstandards wurden mit Kugelschreiber markiert und die Membran beschriftet. Zur weiteren Bearbeitung der Membran wurde die restliche rote Farbe mit dest. H₂O vollständig ausgewaschen.

5.9.10 Blocken und Antikörperfärbung

Die nach der Ponceau S Färbung gewaschene Membran wurde nun mit 5 % Milchpulver in PBS-Tween (PBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20) für 1,5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde sie 3x für je 10 min mit PBS-Tween gewaschen. Es erfolgte die erste Antikörperfärbung der geblockten und gewaschenen Membran mit 5 % Milchpulver in PBS-Tween für 1,5-2 h bei RT oder für 4 °C über Nacht. Die für die einzelnen Proteine eingesetzten Antikörper und ihre Verdünnungen können aus Tabelle 5-7 entnommen werden.

Tabelle 5-7: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen.

Antikörper	Verdünnung
β-catenin	1:4000
hPPARβ	1:1000
2. Antikörper	1:5000

Nach der Inkubationszeit des ersten Antikörpers wurde die Membran erneut 3x für je 10 min mit PBS-Tween gewaschen. Der nun folgende zweite Antikörper war gegen den ersten gerichtet und wurde nach Herstellerangaben in 5 % Milchpulver in PBS-Tween verdünnt und für mindestens 1,5 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht auf der Membran inkubiert. Bevor eine Proteindetektion mit dem ECL-System von Amersham erfolgen konnte, wurde die Membran 3x für je 10 min mit PBS-Tween gewaschen.

Primäre Antikörper

PPAR β (H-74)
rabbit polyclonaler Antikörper
200 μ g IgG in 1ml PBS
Santa Cruz
Empfohlene Verdünnung 1:200 - 1:1000

Catenin-beta Ab-1
rabbit polyclonaler Antikörper
1000 μ g IgG in 1ml PBS (10 mM)
Dunn Labortechnik GmbH
Empfohlene Verdünnung 2,5-5 μ g/ml

Sekundärer Antikörper

Rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked whole antibody from donkey
Amersham Pharmacia biotech
Benutzte Verdünnung 1:5000

5.9.11 ECL-Entwicklung

Die antikörpergefärbte Membran wurde nun in der Dunkelkammer mittels des ECL-Kits (ECL Western Blotting Analysis System, Amersham Bioscience) entwickelt. Hierzu wurden die beiden Reagenzien des Kits im Verhältnis 1:1 gemischt. Für eine Membran wurden insgesamt 1,5 ml benötigt. Bei einer schwachen Proteinexpression wurden zusätzlich je 100 μ l ECL advanced Lösungen (Lumigen TMA-6, Amersham Bioscience) zugesetzt. Die Membran wurde für 60 sec in das ECL-Gemisch gelegt bis sich ein sichtbares grünes Leuchten erkennen ließ. Nach dem Abtropfen der Membran wurde sie mit einer Folie bedeckt und in einer Kassette mit einem Röntgenfilm (HyperfilmTM ECL, Amersham Bioscience) für 30 sec bis 30 min exponiert. Angefangen wurde mit kurzen Zeitpunkten, um die auftretende Bandenstärke der Proteine zu testen. Der Film wurde nach entsprechender Exponierung aus der Kassette genommen und im Entwickler ca. 1 min geschwenkt. Zwischendurch wurde das Entwicklungsstadium kontrolliert.

Bevor der entwickelte Film in das Fixierbad kam, wurde er mit Wasser von Entwicklerresten befreit. Im Fixierer wurde der Film für mindestens 2 min geschwenkt, konnte aber auch bis unendlich darin liegen bleiben. Zum Schluss wurde der Film erneut mit Wasser gewaschen und zum Trocknen aufgehängt.

5.9.12 Auswertung der detektierten Proteinbanden

Der getrocknete Film wurde mit der markierten Membran 1:1 verglichen. Die Markerbanden wurden auf den Film übertragen und die gesuchten Proteinbanden gekennzeichnet. Anhand der Coomassie Blau Färbung des dazugehörigen Gels konnte die Übereinstimmung der aufgetragenen Proteinkonzentration jeder Probe abgeglichen werden. Eine Proteinbestimmung der eingesetzten Proben und/oder eine parallele β -Actin-Färbung der entsprechend dazugehörigen Membran wurde zum besseren Vergleich durchgeführt.

5.10 Statistik

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD (Standard deviation) ausgedrückt und wurden mit der Software Microsoft® Excel 97 berechnet. Die Anzahl der Wiederholungen n ist für jeden Versuch im Ergebnisteil gesondert angegeben. Zur Analyse der signifikanten Unterschiede von behandelten Gruppen zu den jeweiligen Kontrollen wurden drei Tests verwendet. Student's t-test und ANOVA (Analysis of variance) mit anschließendem Tukey Test wurden mit dem Statistikprogramm SigmaStat™3.1 durchgeführt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde mit $P < 0,05$ (*) gekennzeichnet.

Alle Berechnungen der halbmaximalen Wachstumshemmung der Modellsubstanzen wurden mit dem Programm TableCurve 2D durchgeführt. Die daraus resultierenden Konzentrationen wurden als IC_{50} Werte der Proliferation angegeben. Alle Graphiken der Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden mit SigmaPlot™9.0 dargestellt.

6 Ergebnisse

6.1 Zytotoxizitätsbestimmungen der einfach und mehrfach ungesättigten sowie der verzweigtkettigen Fettsäuren

Alle eingesetzten Substanzen wurden vor Versuchsbeginn mittels der Neutralrot-Methode (Abschnitt 5.7.1) auf ihre zytotoxischen Eigenschaften hin untersucht. Hierzu wurden alle Fettsäuren im Konzentrationsbereich von 0 bis max. 350 μM getestet. In Tabelle 6-1 sind die ermittelten Daten der einzelnen Fettsäuren am Beispiel der Caco-2 wt Zellen konzentrationsabhängig erfasst. Die Zytotoxizitätsdaten der verwendeten Fettsäuren in den untersuchten Konzentrationsbereichen zeigten keine negativen Effekte. Mit Ausnahme von 200 μM 10E,12Z-CLA lag der Anteil der toten Zellen in Konzentrationen $\leq 200 \mu\text{M}$ nicht signifikant unter denen der Kontrollgruppen. Alle weiteren in dieser Arbeit aufgeführten Zelllinien zeigten ebenfalls im Bezug auf die Testsubstanzen keine oder nur geringe Effekte in den Konzentrationsbereichen $\leq 200 \mu\text{M}$. Aufgrund dieser Tatsache konnten alle im weiteren Verlauf dieser Arbeit ermittelten Effekte als Folge der Substanzen auf die zellulären, molekularen und genetischen Mechanismen der Zellen betrachtet werden.

Tabelle 6-1: Konzentrationsabhängige Zytotoxizität der verwendeten Testsubstanzen am Beispiel der Caco-2 wt Zelllinie. Die lebenden Zellen wurden in % der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Alle Messungen sind der Mittelwert \pm SD (n=8). Signifikante Unterschiede sind mit * ($P < 0,05$) angegeben.

Konzentration [μM]	Zytotoxizität [% lebender Zellen]			
	Trans-Vaccensäure	9Z,11E-CLA	10E,12Z-CLA	Phytansäure
10	99 \pm 2,7	101 \pm 7,4	99 \pm 5,3	98 \pm 5,6
25	99 \pm 4,6	107 \pm 7,9	97 \pm 7,1	105 \pm 9,5
50	99 \pm 4,1	113 \pm 5,6	91 \pm 2,9	99 \pm 7,6
100	104 \pm 5,1	117 \pm 8,2	95 \pm 4,1	107 \pm 7,9
150	106 \pm 8,2	110 \pm 11,8	96 \pm 4,7	111 \pm 6,3
200	92 \pm 6,8	95 \pm 5,0	83 \pm 3,9*	104 \pm 6,6
250	86 \pm 7,9	83 \pm 7,5	86 \pm 4,8	86 \pm 5,7
300	92 \pm 4,7	81 \pm 3,7	83 \pm 3,4*	91 \pm 7,7
350	92 \pm 1,2	89 \pm 6,3	84 \pm 8,7*	86 \pm 7,2

6.2 Einfach ungesättigte Fettsäuren (Trans-Vaccensäure)

Als Beispiel für die Analyse von einfach ungesättigten Fettsäuren und deren Rolle in der Kolonkarzinogenese wurde Trans-Vaccensäure (TVA) eingesetzt. TVA ist bekannt als Precursor für CLAs. Es sollte untersucht werden, ob TVA selber auch Aktivitäten in den molekularen Signalwegen zeigen könnte.

6.2.1 PPAR δ -Aktivierung durch Trans-Vaccensäure

Der Reporterassay zur Rezeptoraktivierung sollte zeigen, inwieweit eine einfach ungesättigte Fettsäure mit dem Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor δ interagieren und ihn aktivieren könnte. Hierzu wurde pGal4-hPPAR δ mit dem Luciferasereporterplasmid pUAS-TK-Luc in HEK293 Zellen cotransfiziert. Nach konzentrationsabhängiger Behandlung der Zellen mit Trans-Vaccensäure wurde nach 48 h die Luciferaseaktivität im Zellysate ermittelt. TVA konnte den Rezeptor aktivieren. Bei einer Konzentration von 200 μ M TVA lag die Aktivierung bei einem Faktor von 6,7 und war damit mit der Phytansäure (Abb. 6-56) vergleichbar. Die beiden CLA-Isomere (Abb. 6-5) zeigten eine stärkere Aktivierung in diesem Bereich. Die Positivkontrolle (100 μ M Bromopalmitat) induzierte den Rezeptor in gewünschter Weise und konnte als Standard verwendet werden.

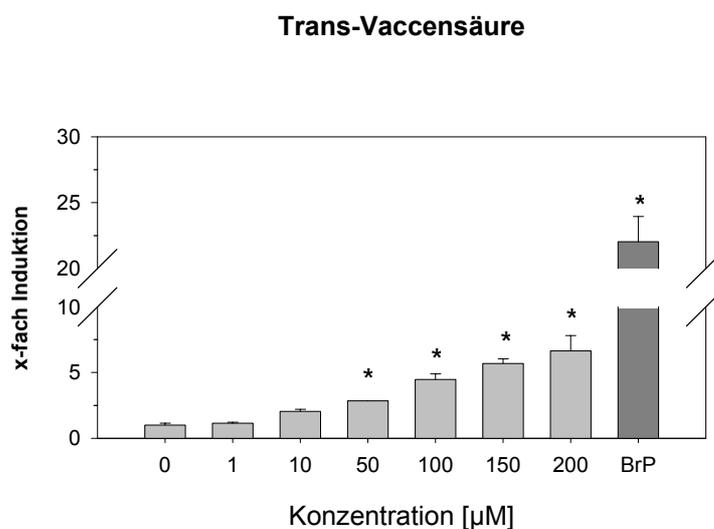


Abbildung 6-1: PPAR δ -Aktivierung durch Trans-Vaccensäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinate ist die Induktion des Rezeptors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

6.2.2 Proliferationsverlauf verschiedener Zelllinien nach Trans-Vaccensäure Induktion

Die Untersuchung der Proliferation sollte Aufschluss geben, ob die Trans-Vaccensäure auch direkt die Proliferation hemmen konnte. Hierzu wurden die Zelllinien Caco-2, HT29 und F9 ausgesät (Abschnitt 5.5.3) und 3 Tage mit steigender Trans-Vaccensäurekonzentration behandelt. In Abbildung 6-2 wurde deutlich, dass in keiner der vorliegenden Zelllinien eine Proliferationshemmung, die vergleichbar stark wäre, wie die bei den anderen Fettsäuren (Abschnitt 6.3.4), erreicht werden konnte. Trans-Vaccensäure zeigte in den eingesetzten Konzentrationsbereichen bis 300 μM keine Hemmung des Wachstums.

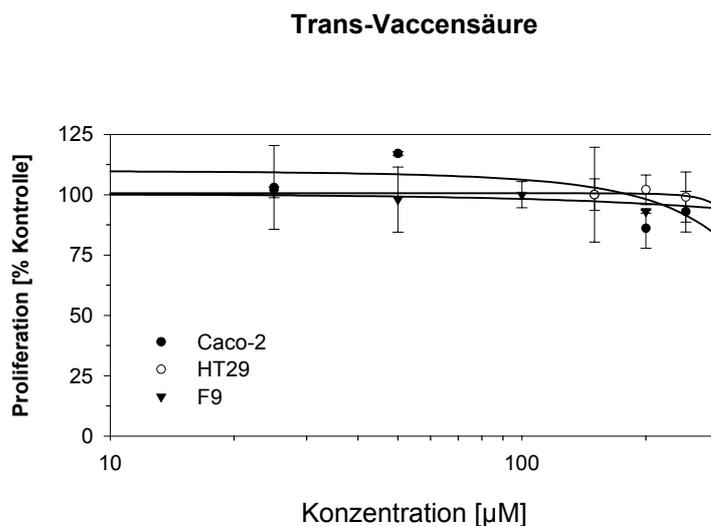


Abbildung 6-2: Proliferationsverlauf verschiedener Zelllinien nach konzentrationsabhängiger Trans-Vaccensäure Behandlung. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=5$). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.

6.2.3 Trans-Vaccensäure und Differenzierung

Es konnte gezeigt werden, dass die Trans-Vaccensäure die Proliferation der Beispiellinien im untersuchten Konzentrationsbereich bis 300 μM nicht wesentlich inhibiert. Zur weiteren Charakterisierung dieser einfach ungesättigten Fettsäure wurde im Folgenden ein möglicher Effekt auf die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen untersucht.

6.2.3.1 Einfluss der Trans-Vaccensäure auf die Intestinale Alkalische Phosphatase in der Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen

Caco-2 Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit steigender TVA-Konzentration für 7 Tage behandelt. Nach Präparation der Bürstensaummembran wurde die Intestinale Alkalische Phosphatase als Markerenzym der Differenzierung im Homogenat gemessen (Abschnitt 5.6.4). Die ermittelten Daten aus diesem Enzymtest konnten keine signifikante Veränderung im Bezug auf den Differenzierungszustand der behandelten Kolonzellen aufzeigen (Daten sind nicht gezeigt).

6.2.3.2 Promotorstudien zur IAP-Aktivität in Kolonkarzinomzellen nach Behandlung mit TVA

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss dieser Fettsäure auf ihre Differenzierungsfähigkeit hin zu untersuchen, ist die Messung der Promotoraktivität der IAP. Hierzu wurden Caco-2 Zellen mit dem Promotorplasmid der IAP ($\text{pIAP}_{2,4}\text{-Luc}$) transfiziert und anschließend mit Trans-Vaccensäure konzentrationsabhängig induziert. Nach 24 h konnte die Aktivität des Promotors mittels Luciferase bestimmt werden (Abschnitt 5.5.1). Wie in Abbildung 6-3 zu erkennen ist, zeigte der IAP-Promotor eine leichte Aktivierung mit steigender TVA-Konzentration. Der Faktor 2 bei 200 μM TVA lag weit unter dem der CLAs.

Eine Induktion der IAP im Konzentrationsbereich der konjugierten Linolsäureisomere (> 4), konnte durch die Trans-Vaccensäure nicht erreicht werden.

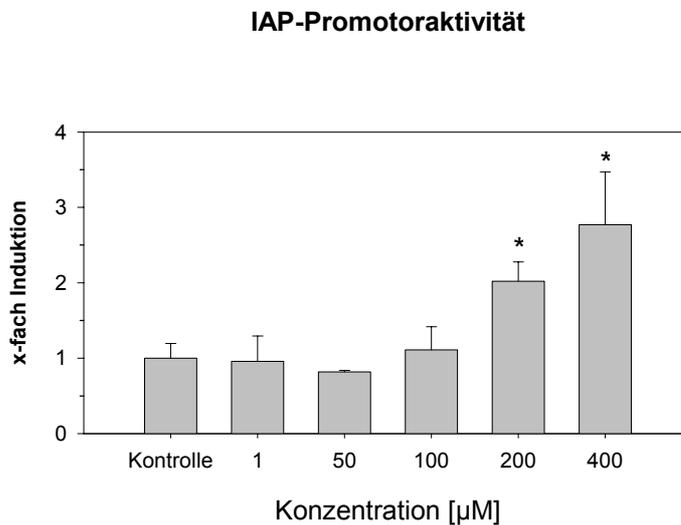


Abbildung 6-3: Promotoraktivität der IAP in Caco-2 Zellen nach Induktion mit Trans-Vaccensäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die Trans-Vaccensäure nur einen untergeordneten Einfluss auf die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen zu haben schien. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen von Differenzierungsmarkern (CEA, SI, iFABP), sowie Genexpressionsstudien im Bezug auf Proliferationsgene und die Wirkung von TVA auf den APC- β -Catenin-TCF-4-Signalweg von Karzinomzellen nicht durchgeführt. Genauere Studien der Proliferation, Differenzierung, Genexpression und Apoptose sollten sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit hauptsächlich auf die Effekte und Aufklärung der CLAs konzentrieren.

6.2.4 Trans-Vaccensäure und die Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ

Trans-Vaccensäure zeigte keine signifikante Proliferationshemmung in Caco-2 wt Zellen im untersuchten Konzentrationsbereich. Analysiert werden sollte nun, ob eventuell der Einfluss von hPPAR δ den Proliferationsverlauf von mit TVA behandelten Kolonzellen verändern könnte. Hierzu wurden die hPPAR δ -überexprimierenden und –reprimierenden Caco-2 Klone (+/+ Klon 3, DN Klon 7; Kapitel 6.4) herangezogen. Um Vergleiche anstellen zu können, richteten sich Versuchsaufbau, Durchführung und Auswertungen nach den Angaben aus den vorherigen Proliferationsversuchen (Abschnitt 6.2.2).

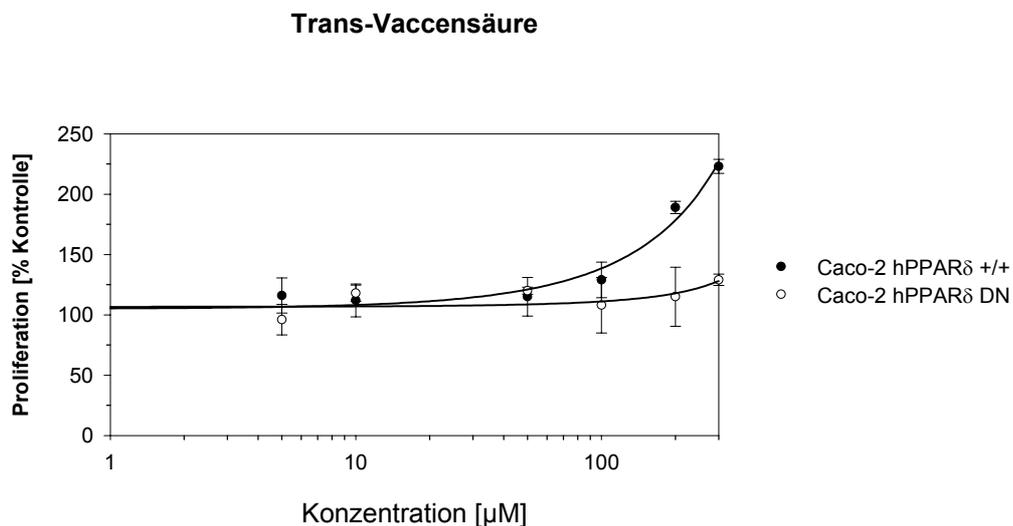


Abbildung 6-4: Proliferationsverlauf der Caco-2 Klone nach Behandlung mit Trans-Vaccensäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=4). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.

In beiden Klonen wurde die Proliferation durch die Trans-Vaccensäure aktiviert. Eine Hemmung trat im untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner Zeit ein. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit der Fettsäure nicht eingesetzt werden. Die einzige Korrelation zwischen der TVA und den CLAs war, dass der hPPAR δ -überexprimierende Klon 3 in seinem Wachstum über der reprimierenden Zelllinie lag. PPAR δ ist in Tumorgewebe stark exprimiert und steuert die zunehmende Proliferation der Zellen, was auch hier sichtbar wurde. Trans-Vaccensäure könnte anfänglich sogar eine Stimulation des Wachstums initiieren.

6.3 Konjugierte Linolsäureisomere als Beispiel für mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Im nächsten Abschnitt sollten mehrfach ungesättigte Fettsäuren im Zentrum des Interesses stehen. Als Beispiel hierfür wurden das biologische Hauptisomer der konjugierten Linolsäure 9Z,11E-CLA und das offenbar besonders aktive Minorisomer 10E,12Z-CLA gewählt. Für einige der konjugierten Linolsäureisomere wurden bereits tierexperimentell und in Untersuchungen an Zellkulturen positive Wirkungen nachgewiesen (Kapitel 2.3). Inwieweit diese Substanzen auch prophylaktisch oder therapeutisch bei Erkrankungen des Darms verwendet werden könnten und als funktionelle Inhaltsstoffe von Lebensmitteln zu bezeichnen sind, sollte in der folgenden Studie analysiert werden.

6.3.1 Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ (PPAR δ) durch konjugierte Linolsäureisomere

Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind, wie in Abschnitt 2.5 erläutert, Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die u.a. von Fettsäuren aktiviert werden können. Da in dieser Arbeit die Rolle von PPAR δ während der Kolonkazinogenese genauer charakterisiert werden sollte, wurden zunächst die konjugierten Linolsäureisomere hinsichtlich ihrer aktivierenden Potenz im Bezug auf PPAR δ untersucht. Hierzu wurden humane HEK293 Zellen mit dem Rezeptorkonstrukt pGal4-hPPAR δ und pUAS-TK-Luc transient co-transfiziert [Kliwer et al., 1997; Lampen et al., 2003]. Die Analyse der PPAR δ -Aktivierung erfolgte konzentrationsabhängig am Beispiel der ausgewählten konjugierten Linolsäureisomere 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA nach einer Induktion von 48 h mit einem Luciferaseassay (Abschnitt 5.5.1). Als Positivkontrolle wurde Bromopalmitat (BrP) mit einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Beide CLAs erwiesen sich als Liganden des Rezeptors und aktivierten hPPAR δ mit steigender Konzentration.

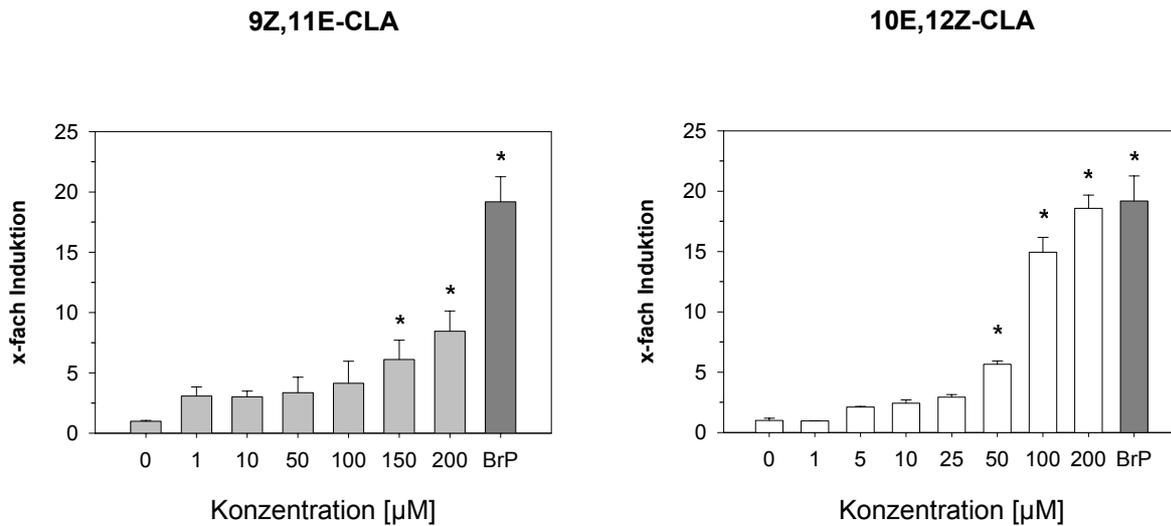


Abbildung 6-5: Vergleich der PPAR δ -Aktivierung durch die beiden CLA-Isomere 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf den Ordinatenachse ist jeweils die Induktion des Rezeptors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Bei einem direkten Vergleich der Isomere war festzustellen, dass das Minorisomer 10E,12Z-CLA potenter war und hPPAR δ stärker aktivierte. 200 μM aktivierten den Rezeptor um den Faktor 18,6 und waren damit vergleichbar mit der Positivkontrolle Bromopalmatit, die eine Induktion von 19,2 bewirkte.

6.3.2 Aktivierung des Retinsäure Rezeptors und des Retinoid X Rezeptors durch CLA-Isomere in HEK293 Zellen

Die CLA-Isomere zeigten sich als Aktivatoren des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors delta. Aufgrund der Möglichkeit von PPAR δ Heterodimere mit Retinoid Rezeptoren einzugehen, wurden die Fettsäuren auf ihre spezifische Aktivierung der Retinoid Rezeptoren RAR und RXR untersucht. HEK293 Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und mit dem jeweiligen Rezeptor pCMX-Gal4-hRAR α bzw. pCMX-Gal4-hRXR α und dem Luciferaseplasmid pUAS-TK-Luc co-transfiziert (Abschnitt 5.4.1). Nach einer konzentrationsabhängigen Behandlung der Zellen mit den Linolsäureisomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA von 36 h konnte die Luciferaseaktivität gemessen werden. Als Positivkontrolle wurde für beide Rezeptoren 1 μ M all-trans Retinsäure (at-RA) eingesetzt.

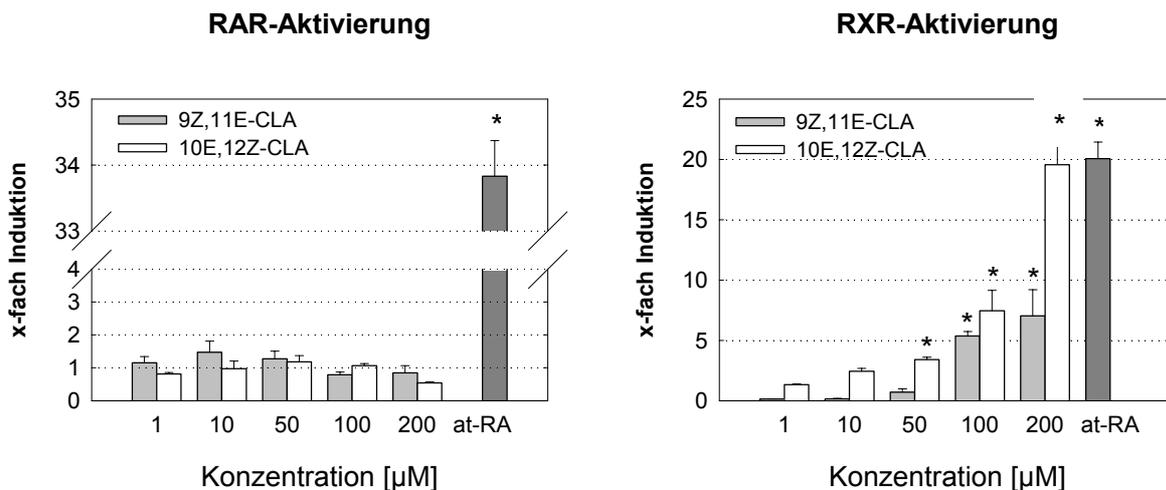


Abbildung 6-6: RAR- und RXR-Aktivierung durch die CLAs. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf den Ordinatenachsen ist jeweils die Induktion des Rezeptors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P < 0,05$) angegeben.

Beide Linolsäureisomere hatten das Vermögen RXR als Master-Regulator zu aktivieren. Der konkret für die Bindung der all-trans Retinsäure bekannte Rezeptor RAR konnte nicht mit diesen Fettsäuren interagieren. 1 μ M all-trans Retinsäure aktivierte den RAR mit dem Faktor 32. Der RXR wurde von der Positivkontrolle mit dem Faktor 20 aktiviert und war somit vergleichbar mit 200 μ M des Minorisomers 10E,12Z-CLA. Die 9Z,11E-CLA erreichte bei dieser Konzentration gerade mal eine Aktivität vom Faktor 7.

6.3.3 Genexpressionsstudien von PPAR δ in humanen HT29 Zellen

Der humane Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor δ erwies sich in Abschnitt 6.3.1 als durch die CLAs aktivierter nukleärer Transkriptionsfaktor. Es ist daher wahrscheinlich, dass die beiden konjugierten Linolsäureisomere auch die Genexpression von PPAR δ beeinflussen können. Für diese Studie wurden humane HT29 Kolonkarzinomzellen konzentrationsabhängig mit den CLA-Isomeren behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (6–48 h) geerntet und bei -80°C gelagert. Nach Abschluss der Versuchsreihe wurde von allen Proben Gesamt-RNA nach Chomczynski & Sacchi (Abschnitt 5.8.1) präpariert. Unter Verwendung der semiquantitativen RT-PCR-Methode (Abschnitt 5.8.6) wurden die Transkriptmengen von *hPPAR δ* bestimmt. Um die Expressionsraten vergleichbar machen zu können, musste zunächst ein Genexpressionsprofil von *hPPAR δ* in unbehandelten HT29 Zellen ermittelt werden. Zur Standardisierung des Zielgens wurde das „housekeeping Gen“ *β -actin* herangezogen.

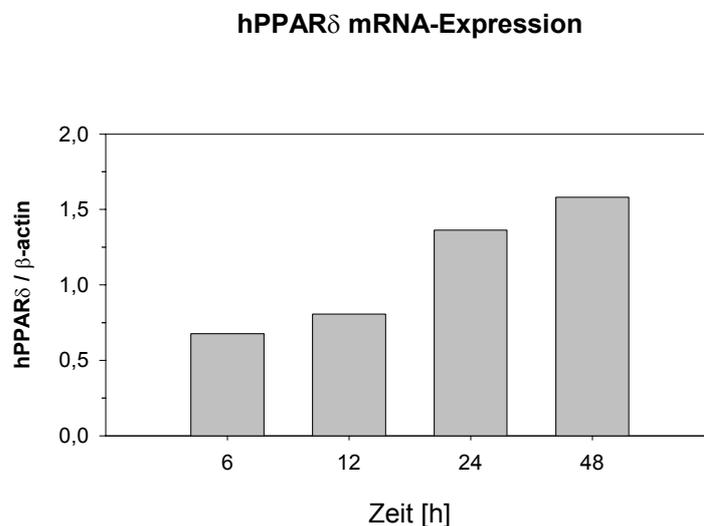


Abbildung 6-7: Zeitabhängige PPAR δ mRNA-Expression in unbehandelten HT29 Zellen. Gezeigt ist die densitometrische Auswertung eines repräsentativen Gels von drei unabhängigen Experimenten.

Die mRNA-Expression von *hPPAR δ* stieg im Zeitverlauf der Zellproliferation kontinuierlich an.

Ergebnisse

Um im zweiten Schritt die Effekte der CLAs auf die Genexpression zu analysieren, wurden die Expressionsprofile von *hPPAR δ* in den behandelten HT29 Zellproben ermittelt. Zur Standardisierung diente auch hier *β -actin*. Jede Expression wurde auf ihre jeweilige unbehandelte Kontrolle bezogen und ausgewertet. Die Werte beziehen sich auf die densitometrische Auswertung repräsentativer Gele.

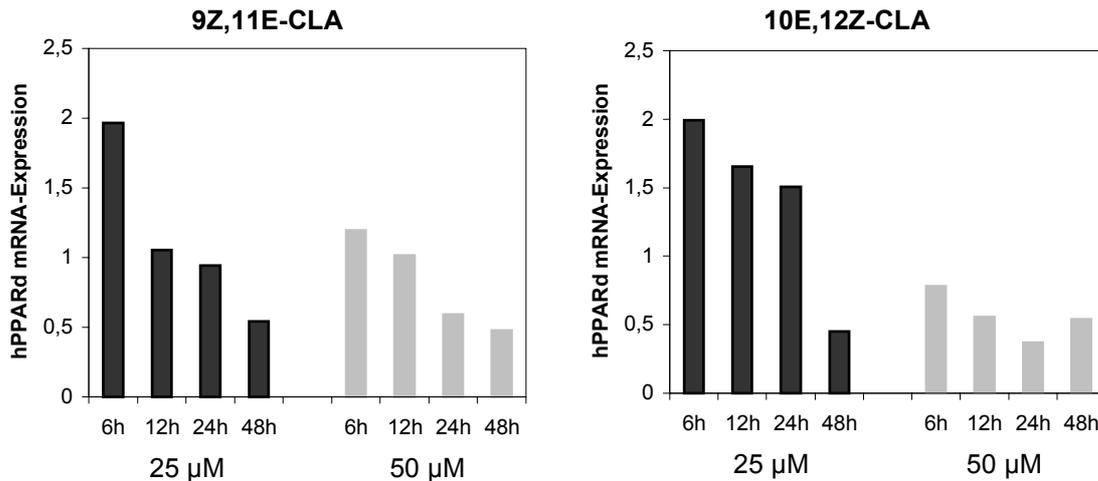


Abbildung 6-8: mRNA-Expression von *PPAR δ* in HT29 Zellen nach Behandlung mit den Isomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Auf den Ordinatenachsen ist die Aktivierung des Gens nach Normalisierung mit *β -actin* relativ zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt.

In Abbildung 6-8 war zu erkennen, dass beide CLA-Isomere die Expression von *hPPAR δ* zeitabhängig hemmen. Konzentrationen $\leq 25 \mu\text{M}$ zeigten eine anfängliche Aktivierung des Rezeptors in den ersten 24 h. Auch hier war zu erkennen, dass das potentere Minorisomer einen stärkeren Effekt auf *PPAR δ* ausübte, als das Hauptisomer. In geringen Konzentrationen konnte die 10E,12Z-CLA das Gen stärker aktivieren, höhere Konzentrationen hingegen lösten eine deutlich stärkere und schnellere Hemmung der Expression aus. Nach einer Behandlung der HT29 Zellen von 6 h stand der Faktor 1,2 bei 50 μM 9Z,11E-CLA dem Wert von 0,8 bei vergleichender Behandlung der Zellen mit dem potenteren Isomer gegenüber.

6.3.4 Proliferationsstudien

6.3.4.1 Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von konjugierten Linolsäureisomeren in humanen Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu einer embryonalen Teratokarzinom-Stammzelllinie der Maus

In den vorherigen Untersuchungen erwies sich das Minorisomer 10E,12Z-CLA als das wirksamere Isomer der konjugierten Linolsäure im Hinblick auf die Aktivierung des Rezeptors und Hemmung der Genexpression von *hPPAR δ* . Da die Entstehung eines Kolonkarzinoms mit einer erhöhten Zellproliferation einhergeht, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die CLAs möglicherweise wachstumshemmende Wirkungen haben könnten. Hierzu wurden die humanen Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und HT29 sowie die Teratokarzinomzelllinie F9 eingesetzt und miteinander verglichen. Alle drei Zelllinien wurden nach Aussaat in 96-Well Platten für 72 h mit steigenden Konzentrationen der konjugierten Linolsäureisomere 9Z,11E-, 10E,12Z- und 9E,11E-CLA behandelt. Die Messung der Proliferation wurde anschließend mit dem „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ (Promega, G3582) durchgeführt (Abschnitt 5.5.3).

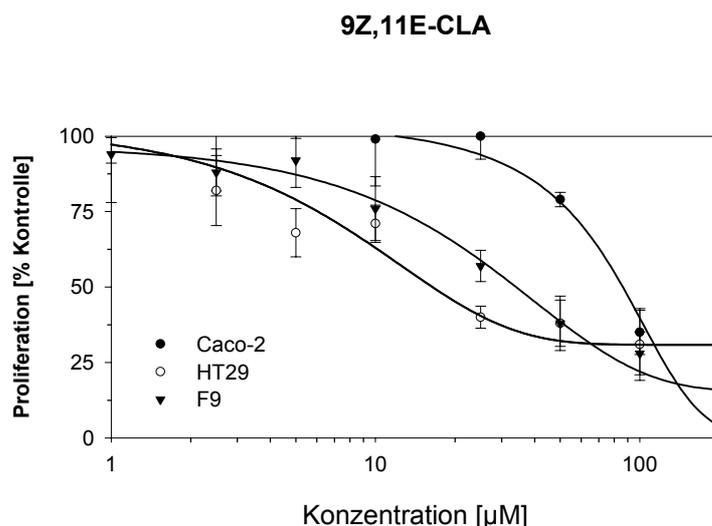


Abbildung 6-9: Proliferation der Zelllinien unter Einfluss des Hauptisomers 9Z,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=5$). Auf der Ordinatenaachse ist die Proliferation der behandelten Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100% Wachstum bezeichnet. Alle Werte ab 82 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar ($P<0,05$).

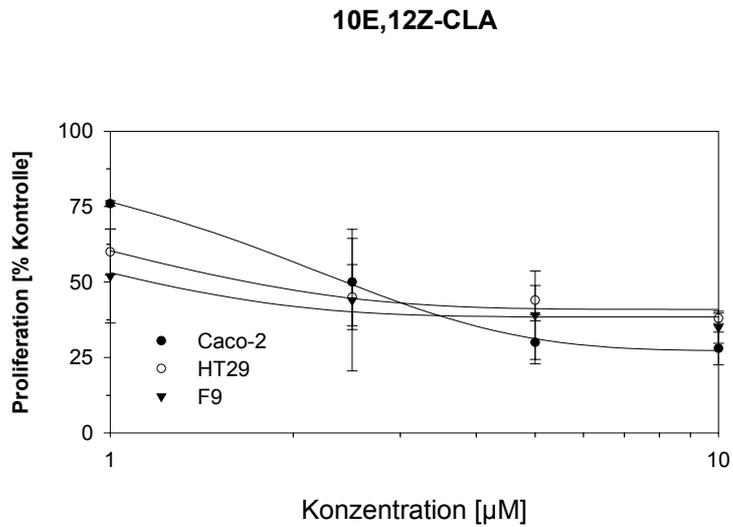


Abbildung 6-10: Proliferation der Zelllinien unter Einfluss des Minorisomers 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatennachse ist die Proliferation der behandelten Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100% Wachstum bezeichnet. Alle Werte stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar (P<0,05).

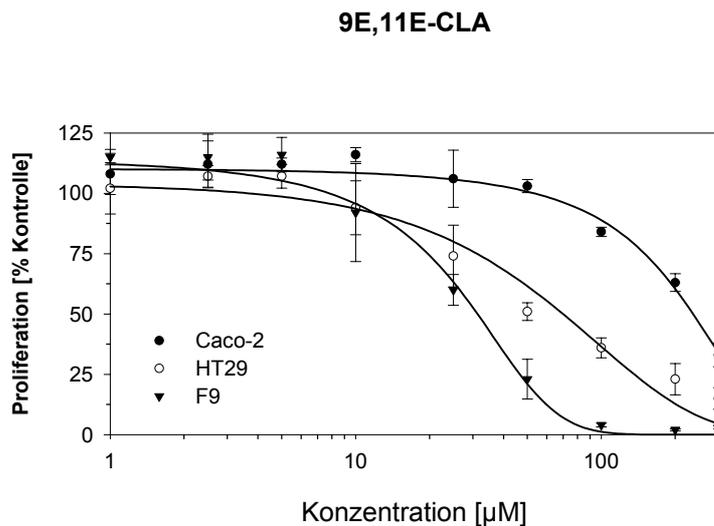


Abbildung 6-11: Proliferation der Zelllinien unter Einfluss des Minorisomers 9E,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatennachse ist die Proliferation der behandelten Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100% Wachstum bezeichnet. Alle Werte ab 84 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar (P<0,05).

Ergebnisse

Aus der in Abbildung 6-10 gezeigten Dosis-Wirkungs-Beziehungen ist deutlich zu erkennen, dass im Falle der 10E,12Z-CLA eine niedrigere Konzentration von 3,1 μM notwendig war, um das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 um 50 % zu reduzieren. Das Hauptisomer zeigte einen IC_{50} von 82,1 μM , und im Falle des zusätzlich untersuchten trans-trans-Isomers 9E,11E-CLA lag die 50 %ige Inhibierung sogar bei 233,2 μM . In Tabelle 6-2 sind alle berechneten IC_{50} Werte der Proliferationshemmung zum Vergleich aufgelistet. Erkennbar wurde, dass die Inhibition der verschiedenen CLAs konzentrations- und Zelllinien-abhängig war. Weiterhin wurde deutlich, dass das Minorisomer 10E,12Z-CLA in allen Zelllinien die größten Effekte hervorrufen konnte. Beim Vergleich der Zelllinien untereinander wurde deutlich, dass die Teratokarzinomzelllinie der Maus überwiegend am empfindlichsten zu sein schien. Bei den humanen Zelllinien war eine Abstufung der Sensitivität von Caco-2 zu HT29 Zellen zu erkennen. Konjugierte Linolsäureisomere hatten demnach eine nachgewiesene wachstumshemmende Wirkung auf Kolonkarzinomzelllinien.

Tabelle 6-2: IC_{50} Werte der Proliferationsinhibition von Caco-2, HT29 und F9 Zellen. Alle Werte wurden mit dem Programm TableCurve 2D, Version 5.01 berechnet.

	9Z,11E-CLA	10E,12Z-CLA	9E,11E-CLA
Caco-2 Zellen	82,1 μM	3,1 μM	233,2 μM
HT29 Zellen	21,7 μM	1,8 μM	58,7 μM
F9 Zellen	32,7 μM	1,2 μM	26,8 μM

6.3.4.2 Synergistische Effekte von PPAR δ -Liganden und RXR-Aktivatoren im Bezug auf den Proliferationsverlauf von Caco-2 Zellen

Um die Hypothese zu untersuchen, ob die Heterodimerbildung von RXR und PPAR δ synergistische Effekte hervorrufen kann, wurden Caco-2 Zellen mit dem potenteren 10E,12Z-CLA Isomer behandelt. Zusätzlich dazu wurden diese Zellen parallel mit einem bekannten RXR-Liganden (CD2608) in steigender Konzentration induziert. Nach 3 Tagen wurde die Stoffwechselaktivität der Caco-2 Zellen enzymatisch gemessen (Abschnitt 5.5.3). Der synthetische Ligand CD2608 hatte im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine wachstumsfördernde Wirkung auf die Kolonkazinomzelllinie Caco-2, die sich im Bereich von 1 nM bis 100 nM CD2608 mit ~130 % nicht unterschied (Daten nicht gezeigt). Um zusätzlich die Effekte der CLA in Kombination mit CD2608 vergleichen zu können, wurde das Wachstum der Zellen unter Einfluss des RXR-Liganden jeweils auf 100 % Wachstum normalisiert und die hemmenden Effekte der 10E,12Z-CLA in jeder Gruppe darauf bezogen. In Tabelle 6-3 ist die Proliferation der Zellen in % der jeweiligen Kontrolle angegeben.

Tabelle 6-3: Synergistische Effekte auf das Wachstum der Zellen nach kombinierter Behandlung mit CD2608 und 10E,12Z-CLA. Die Proliferation der Caco-2 Zellen wurde in % der jeweiligen Kontrolle dargestellt. Alle Messungen sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

	Proliferation [% der jeweiligen Kontrolle]		
	1 nM CD2608	10 nM CD2608	100 nM CD2608
1 μ M 10E,12Z-CLA	94 \pm 5,2	89 \pm 7,3	54 \pm 0,5*
5 μ M 10E,12Z-CLA	83 \pm 6,8*	73 \pm 12,9*	42 \pm 15*
50 μ M 10E,12Z-CLA	61 \pm 1,8*	59 \pm 6*	45 \pm 7,1*
100 μ M 10E,12Z-CLA	51 \pm 5,9*	41 \pm 10,5*	41 \pm 8,3*
200 μ M 10E,12Z-CLA	46 \pm 6,9*	36 \pm 13,3*	35 \pm 7,9*

Schon bei der Zugabe von 1 μ M 10E,12Z-CLA unterschied sich das Wachstumsverhalten der Zellen in den einzelnen Gruppen von 94 % (1 nM CD2608) bis 54 % (100 nM CD2608) stark voneinander. Der synthetische RXR-Ligand hatte scheinbar nur in Kombination mit einem PPAR-Liganden potenzierende Wirkung im Bezug auf die Hemmung der Proliferation.

6.3.4.3 Effekte der Linolsäureisomere 9Z,11E-CLA und 10E,12Z-CLA auf die Genexpression von postulierten Proliferationsgenen in intestinalen HT29 Zellen

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass die konjugierten Linolsäureisomere eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Kolonkarzinomzellen hatten. Um zu untersuchen, ob eine Inhibition der Zellproliferation durch CLAs mit der Inhibition der Expression verschiedener Gene der Proliferation korreliert, wurden im Folgenden Markergene der Proliferation in HT29 Zellen charakterisiert. Hierzu wurden Expressionsprofile der Gene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* in der Proliferationsphase von unbehandelten HT29 Zellen im Zeitverlauf zwischen 6 bis 96 h erstellt (Abb. 6-12). Nach Ernte der jeweiligen Zellen wurde die Gesamt-RNA nach Chomczynski & Sacchi (Abschnitt 5.8.1) präpariert und die Transkriptmengen der jeweiligen Gene unter Verwendung der semiquantitativen RT-PCR-Methode (Abschnitt 5.8.6) bestimmt. Zur Standardisierung der Zielgene wurde, wie schon in Kapitel 6.3.3 erwähnt, das „housekeeping Gen“ β -actin herangezogen.

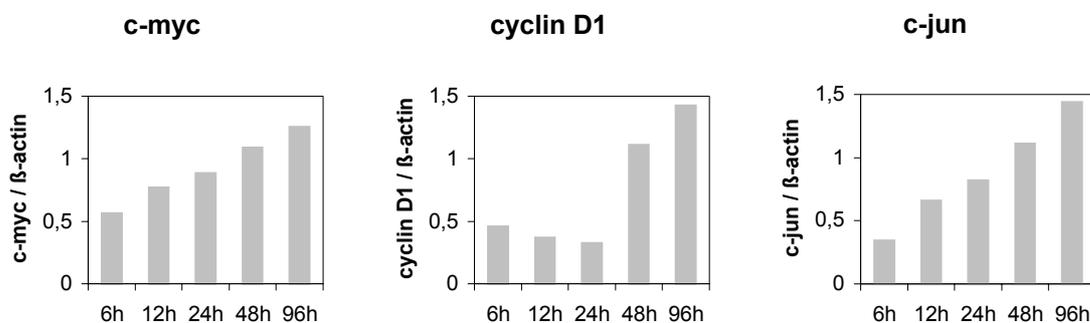


Abbildung 6-12: Zeitabhängige mRNA-Expression von Proliferationsgenen in unbehandelten HT29 Zellen. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Wie erwartet, konnte gezeigt werden, dass die Expression aller drei Proliferationsgene zeitabhängig anstieg. Im weiteren Verlauf der Charakterisierung wurden nun HT29 Zellen im gleichen Zeitraum mit steigenden Konzentrationen der beiden CLA-Isomere 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA behandelt und erneut die Expressionsprofile der Proliferationsmarker ermittelt. Zellernte, Gesamt-RNA-Präparation und Messung sowie Auswertung der Genexpressionen aller Proben richteten sich nach den o.g. Anweisungen. Die densitometrische Auswertung der Proben erfolgte jeweils im Bezug auf die unbehandelten Kontrollen.

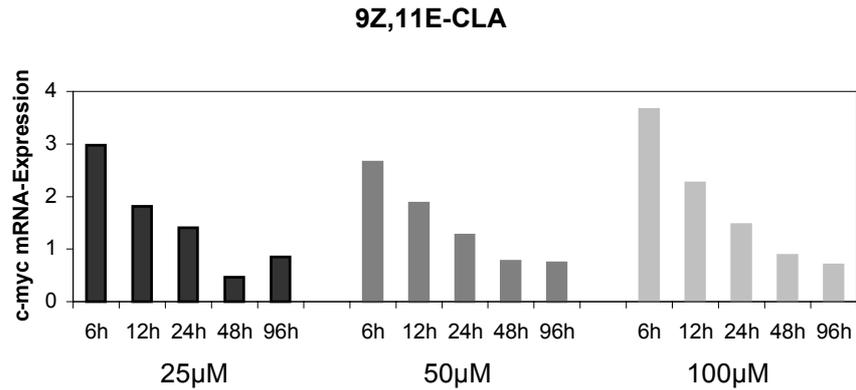


Abbildung 6-13: Effekte von steigender 9Z,11E-CLA Konzentration auf die *c-myc* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt ist die Auswertung repräsentativer Gele. Auf der Ordinatennachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Bei Betrachtung der *c-myc* Expressionen im Zeitverlauf war zu erkennen, dass beide Isomere das Gen mit steigender Konzentration zu inhibieren vermochten. Beim Hauptisomer wurde die Expression nach 96 h von 0,85 (25 µM) auf 0,70 (100 µM) konzentrationsabhängig gehemmt (Abb. 6-13). Das Minorisomer zeigte zum gleichen Zeitpunkt eine hemmende Wirkung von 1,49 (25 µM) zu 0,62 (100 µM) und war somit potenter (Abb. 6-14). Weiterhin kristallisierte sich heraus, dass die 10E,12Z-CLA eine anfängliche Induktion des *c-myc* Gens auslöst und eine Hemmung erst mit zunehmender Zeit einsetzte.

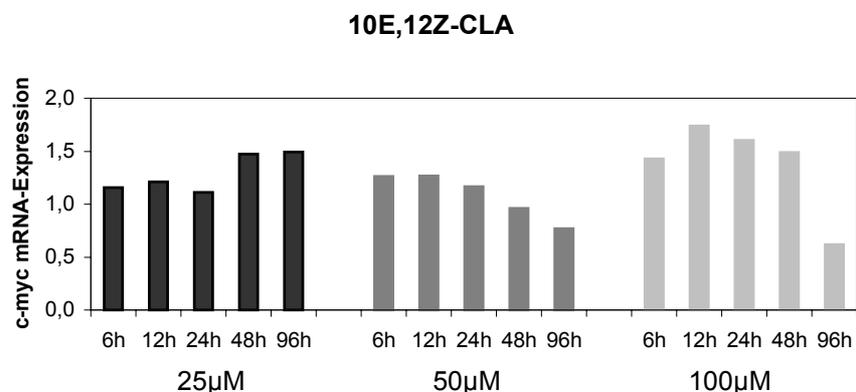


Abbildung 6-14: Effekte von 10E,12Z-CLA in steigender Konzentration auf die *c-myc* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt ist die Auswertung repräsentativer Gele. Auf der Ordinatennachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Ergebnisse

Anhand der gewonnenen cDNA, der mit den CLAs behandelten HT29 Proben, wurde ein weiteres Proliferationsgen, *cyclin D1*, untersucht. Abbildung 6-15 zeigt die Ergebnisse der Expression des *cyclin D1*-Gens nach Inkubation der Zellen mit dem CLA-Hauptisomer 9Z,11E. Die Effekte der Testsubstanz auf die Transkripten des Gens waren in den ersten 24 h stärker und konzentrationsabhängig. Zu erkennen war auch, vergleichbar mit der Expression des *c-myc*-Gens, dass *cyclin D1* in den ersten Stunden der Proliferation durch geringe Konzentrationen 9Z,11E-CLA geringfügig stimuliert werden konnte.

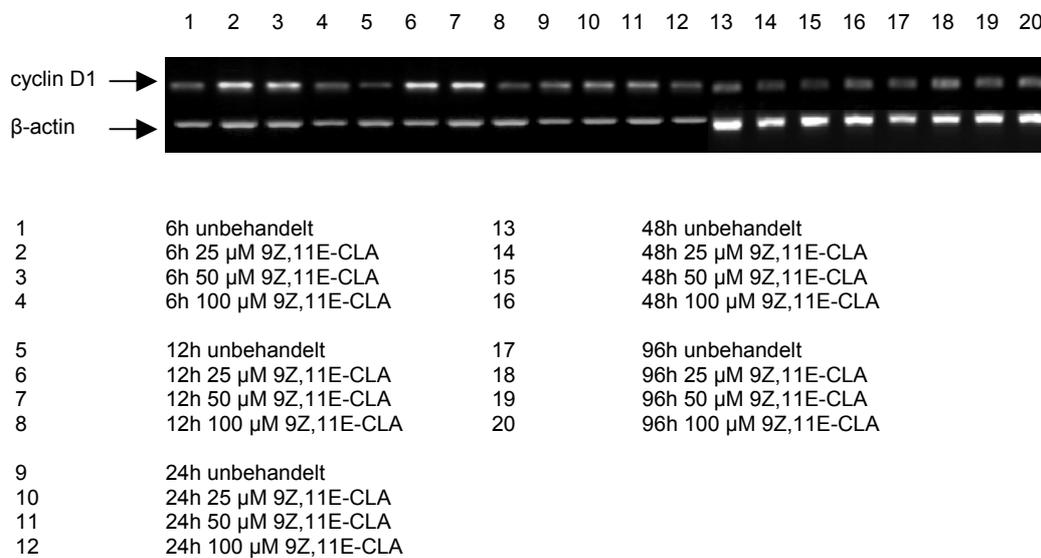


Abbildung 6-15: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR Produkte. Konzentrationsabhängiger Effekt von 9Z,11E-CLA auf die *cyclin D1* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von drei unabhängigen Experimenten. Aufgrund der hohen Probenzahl wurden immer zwei Gele parallel gefahren (Nr. 1-12 und Nr. 13-20).

In Abbildung 6-16 ist die densitometrische Auswertung der *cyclin D1* mRNA-Expression von mit 10E,12Z-CLA behandelten HT29 Zellen zu sehen. In den ersten 12 h waren keine, durch die konzentrationsabhängige CLA-Behandlung hervorgerufenen Effekte, zu detektieren. Erst nach ≥ 24 h konnte eine Hemmung der *cyclin D1* Expression gemessen werden. Am Endpunkt der Messung nach 96 h sank die konzentrationsabhängig durch die 10E,12Z-CLA verursachte Hemmung von 1,34 (25 µM) auf 0,89 (100 µM). *Cyclin D1* wurde demnach weniger stark beeinflusst als das vorher untersuchte *c-myc* Gen.

Ergebnisse

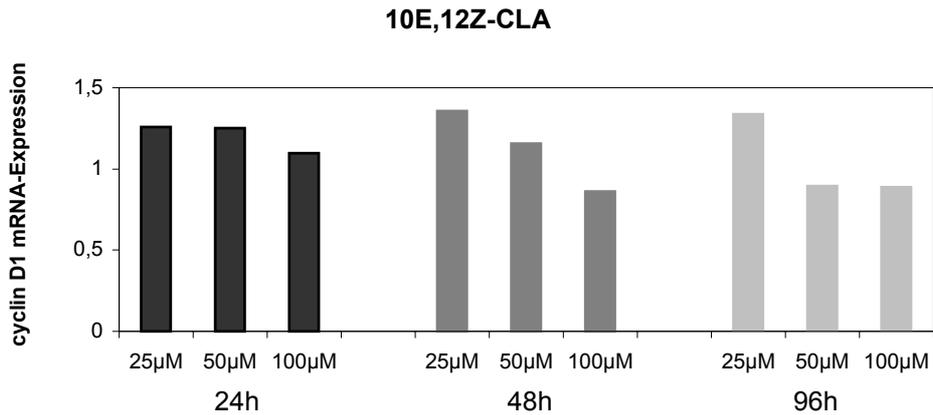


Abbildung 6-16: Effekt von 10E,12Z-CLA auf die *cyclin D1* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt ist die densitometrische Auswertung eines repräsentativen Gels. Auf der Ordinatennachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Als letztes Gen der Proliferation sollte *c-jun* anhand der CLA-behandelten HT29 Proben untersucht werden. Beide CLA-Isomere hemmten die Expression von *c-jun*. Beim Betrachten der Effekte der unterschiedlichen 9Z,11E-CLA-Konzentrationen wurde deutlich, dass eine zeitabhängige Hemmung der *c-jun* mRNA-Expression ausgelöst wurde (Abb. 6-17). Anfänglich wurde die Proliferation durch steigende Konzentration des Hauptisomers allerdings induziert (6 h Werte).

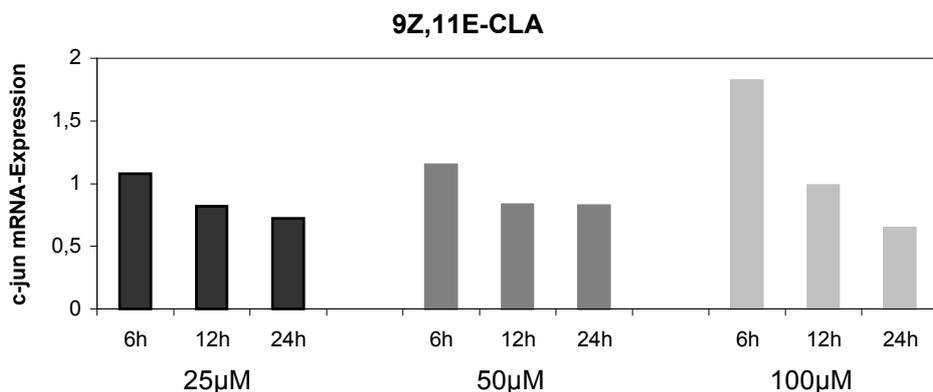


Abbildung 6-17: Zeitlicher Verlauf der *c-jun* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Behandlung mit steigender 9Z,11E-CLA Konzentration. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Auf der Ordinatennachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Ergebnisse

Die densitometrische Auswertung der *c-jun* mRNA-Expression von mit 10E,12Z-CLA behandelten HT29 Proben zeigte erst nach > 48 h eine Hemmung der Genexpression. Mit steigender Konzentration des Minorisomers verringerte sich die Transkriptmenge des Markers *c-jun* in HT29 Kolonkarzinomzellen (Abb. 6-18).

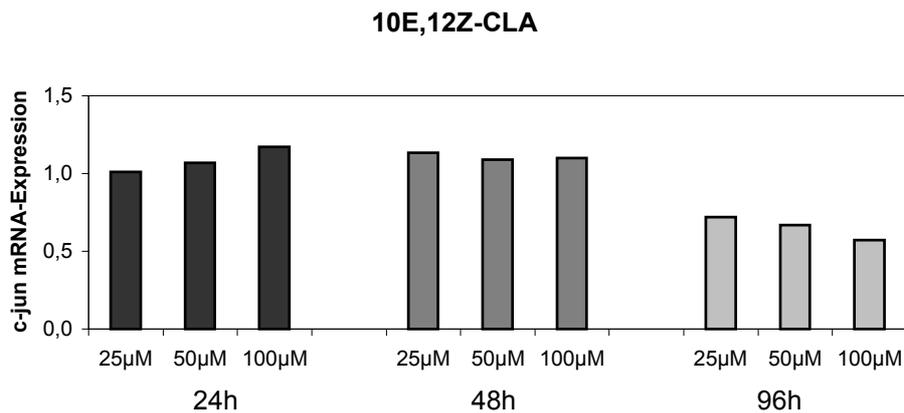


Abbildung 6-18: Konzentrationsabhängiger Effekt von 10E,12Z-CLA auf die *c-jun* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Auf der Ordinatenachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Bei Betrachtung aller drei Proliferationsmarker ließ sich zusammenfassend feststellen, dass die Gene der Proliferation durch die konjugierten Linolsäureisomere konzentrations- und zeitabhängig gehemmt wurden. Eine genaue Quantifizierung der einzelnen Gene konnte aufgrund der semiquantitativen RT-PCR Methode nicht erfolgen. Expressionen der einzelnen Gene, *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun*, konnten nicht direkt miteinander verglichen oder unterschieden werden. Festzustellen blieb, dass beide Isomere der konjugierten Linolsäure eine proliferationshemmende Wirkung auf die untersuchten HT29 Kolonkarzinomzellen hatten und dass das Minorisomer 10E,12Z-CLA durchgehend stärkere Effekte zeigte. Die Inhibition der Zellproliferation (Abschnitt 6.3.4.1) korrelierte demnach mit den Genexpressionsprofilen der Markergene.

6.3.4.4 Durch konjugierte Linolsäureisomere beeinflusste *c-myc* Promotoraktivität als Proliferationsmarker in HEK293 Zellen

Die bisherigen Ergebnisse deuteten auf einen möglichen Einfluss von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen hin. Um dies weiter zu untermauern, wurde die Promotoraktivität des Proliferations-Gens *c-myc* ermittelt. HEK293 Zellen, transfiziert mit einem pMyc-SEAP Konstrukt (Abschnitt 4.7.2), wurden konzentrationsabhängig mit den CLAs behandelt. Nach 24 h wurde das Gesamtprotein aufgereinigt und die Alkalische Phosphatase Aktivität, wie in Abschnitt 5.5.2 beschrieben, bei 405 nm photometrisch gemessen. Als Positivkontrolle wurde 1 mM Valproinsäure (VPA) eingesetzt. VPA stimuliert durch HDAC-Inhibition die Transkription von β -catenin und transaktiviert so Targetgene der Proliferation wie *c-myc* und *cyclin D1* [Blaheta et al., 2002].

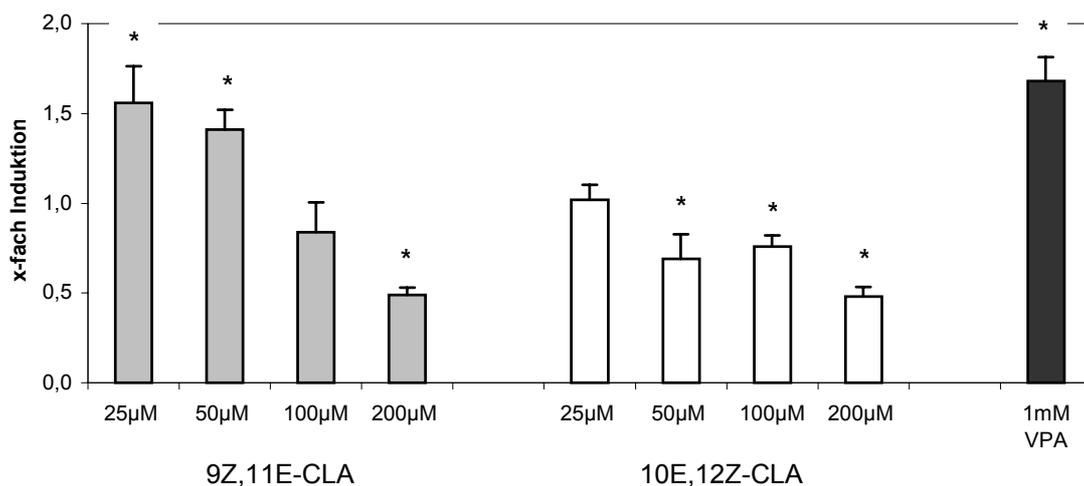


Abbildung 6-19: Aktivierung der 5' flankierenden Region des *c-myc* Gens in HEK293 Zellen nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit den Isomeren 9Z,11E-CLA und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=9). Auf der Ordinatennachse ist die Promotoraktivität relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Beide Isomere inhibierten die Promotoraktivität des *c-myc* Gens konzentrationsabhängig. Das Minorisomer 10E,12Z-CLA hatte einen stärkeren Einfluss auf die Hemmung des Promotors. Diese Ergebnisse unterstützten sehr gut den gemessenen Einfluss der CLAs auf die mRNA-Expressionsprofile der Proliferationsmarker und korrelierten ebenfalls mit der ermittelten Inhibition der Proliferation von HT29, Caco-2 und F9 Zellen nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit den Fettsäuren.

6.3.4.5 Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf die AP1-Aktivität in HEK293 Zellen

Das Aktivator-Protein 1 (AP1) steuert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen der Proliferation. Da die mRNA-Expression von *c-jun* durch die konjugierten Linolsäureisomere konzentrationsabhängig beeinflusst und gehemmt wurde, folgten im Weiteren Untersuchungen mit einem AP1-Reporterassay. Für den Einfluss der beiden konjugierten Linolsäureisomere 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA auf die Proliferation wurde nun zusätzlich ihr Effekt auf die AP1-Aktivität gemessen. HEK293 Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen Isomeren konzentrationsabhängig behandelt, um anschließend die Aktivität des Transkriptionsfaktors mittels Luciferase bestimmen zu können (Abschnitt 5.5.1). Auch hier wurde 1 mM Valproinsäure (VPA) als Positivkontrolle mituntersucht, da bekannt war, dass VPA das *AP1* Gen induziert [Blaheta et al., 2002] und die *c-jun* Expression stimuliert [Yuan et al., 2001].

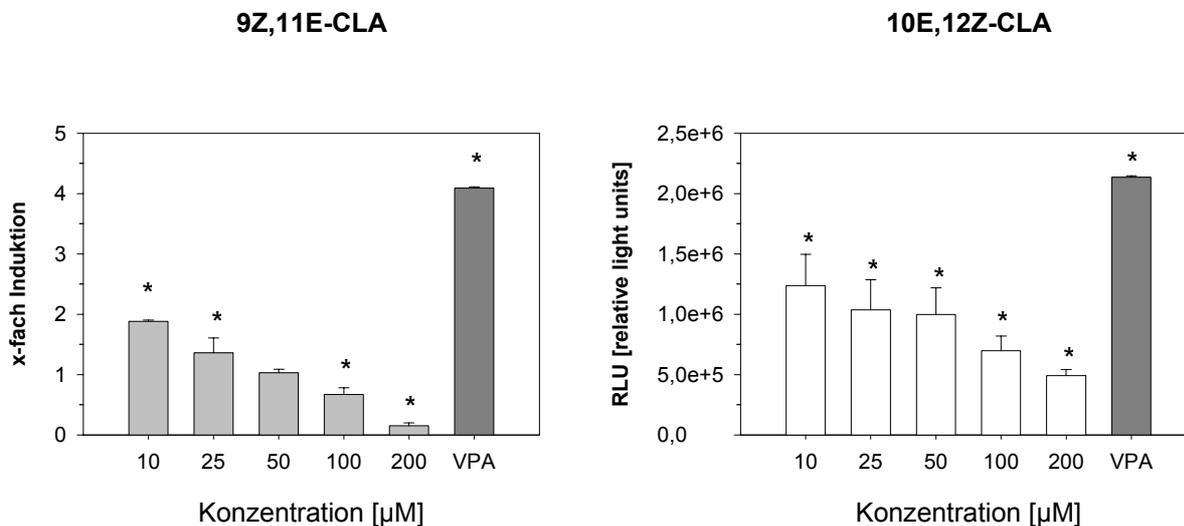


Abbildung 6-20: AP-1 Aktivität in HEK293 Zellen nach konzentrationsabhängiger CLA-Behandlung. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenaachse ist die Aktivität relativ zur Kontrolle bzw. in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

In Abbildung 6-20 war zu erkennen, dass beide CLAs in der Lage waren, mit pAP1-Luc zu interagieren. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1 wurde von beiden Isomeren konzentrationsabhängig inhibiert, wobei ebenfalls eine anfängliche Induktion im niedrigen Konzentrationsbereich zu beobachten war. Die bekannte Positivkontrolle (VPA) aktivierte AP1 erwartungsgemäß um das 4fache. Da beide CLAs die Reporteragenaktivität konzentrationsabhängig beeinflussen konnten, waren diese Ergebnisse ein weiterer Hinweis darauf, dass die konjugierten Linolsäureisomere einen Effekt auf die *c-jun* Genexpression hatten und ebenfalls eine Korrelation zu der Proliferationshemmung der HT29, Caco-2 und F9 Zellen bestand.

6.3.5 Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf die Differenzierung

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die CLAs in der Lage waren, in die Proliferation von Zellen einzugreifen und diese konzentrationsabhängig auf verschiedenen Ebenen zu hemmen. Im Interesse lag nun die Frage, was passiert mit den Zellen, wenn das Wachstum gehemmt wird? Zu diesem Zweck wurden im nächsten Abschnitt die Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf die Differenzierungsfähigkeit von Darmzellen näher charakterisiert. Hierzu dienten in allen Versuchen Caco-2 Zellen, die als Differenzierungsmodell etabliert und bekannt waren. Caco-2 Zellen können nach einigen Tagen der Proliferation in die Differenzierungsphase übergehen und zeigen dann typische Merkmale der Differenzierung, wie die Ausbildung von Mikrovilli und die Induktion der biochemischen Marker IAP, SI, CEA und iFABP. Die möglicherweise von den CLAs veränderte Differenzierung wurde im Folgenden auf drei Ebenen untersucht.

6.3.5.1 Spezifische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase zur Bestimmung der Differenzierung von Caco-2 Zellen durch langkettige Fettsäuren

Die Identifizierung der Dünndarmenterozyten kann auf biochemischem Wege charakterisiert werden. Hierzu wurde die enzymatische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase (IAP) in Caco-2 Zellen bestimmt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 7 Tage lang mit den beiden Isomeren der konjugierten Linolsäure, 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA, konzentrationsabhängig behandelt. Im Anschluss daran konnte die Enzymaktivität der IAP im Zellhomogenat ermittelt werden (Abschnitt 5.6.4). Hierbei zeigte sich in Abbildung 5-21, dass 100 µM 10E,12Z-CLA die IAP-Aktivität in den Kolonkarzinomzellen um den Faktor 4,4 induzierten. Gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen steigerte das Hauptisomer 9Z,11E-CLA die Differenzierung im gleichen Konzentrationsbereich nur um den Faktor 1,8. Beide Isomere konnten die Differenzierung der Kolonkarzinomzellen konzentrationsabhängig induzieren, wobei das Minorisomer wieder potenter zu sein schien.

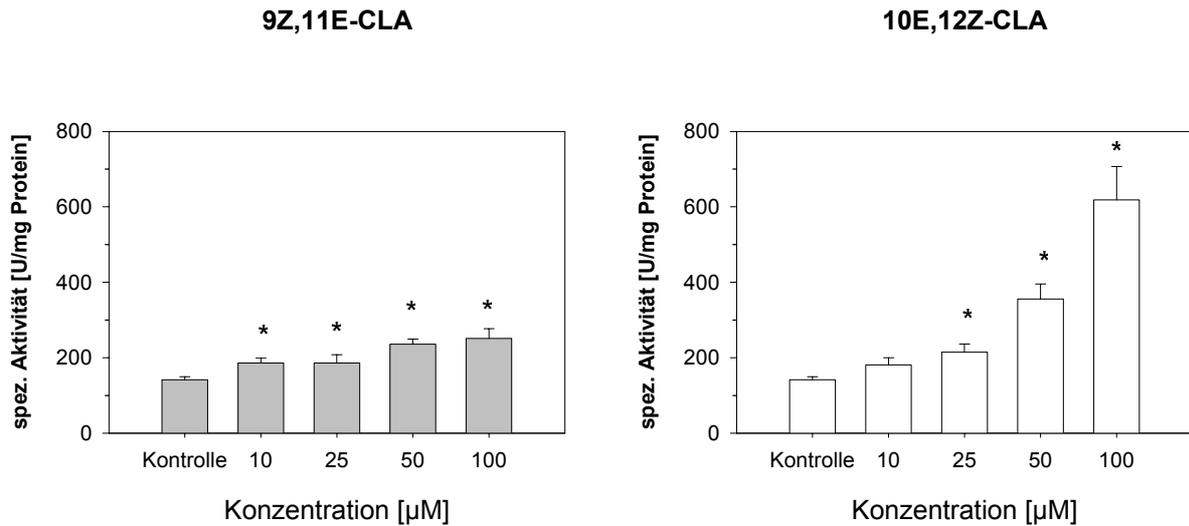


Abbildung 6-21: Spezifische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase in Caco-2 Zellen nach konzentrationsabhängiger Induktion mit den Linolsäureisomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=4). Auf der Ordinatenachse ist die Bildung von p-Nitrophenol pro mg Protein angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P < 0,05$) angegeben.

6.3.5.2. Promotorstudien der Intestinalen Alkalischen Phosphatase in Caco-2 Zellen

Um die Effekte auf das Markerenzym der Differenzierung, die Alkalische Phosphatase (IAP), weiter zu charakterisieren, wurde als nächstes der Promotor der *IAP* untersucht. Hierzu wurden Caco-2 Zellen nach Aussaat in 24-Well Platten mittels der CaPO_4 -Methode mit dem Reporterkonstrukt $\text{pIAP}_{2.4}\text{-Luc}$ [Hinnebusch et al., 2002], welches eine 2,4 kb große 5' flankierende Region der humanen Intestinalen Alkalischen Phosphatase enthielt (Abschnitt 4.7.2), transfiziert. Nach einer konzentrationsabhängigen Inkubation der Zellen mit den beiden CLA-Isomeren konnte die Luciferaseaktivität nach 24 h gemessen werden. Bei diesem Versuch wurden 10 μM Retinsäure (at-RA) als Positivkontrolle eingesetzt [Lampen et al., 2000; Baltés et al., 2004]. Beim Betrachten der Effekte der beiden konjugierten Linolsäureisomere in den Zellen war festzustellen, dass beide CLAs mit der Promotorregion interagierten (Abb. 6-22). Das Minorisomer 10E,12Z-CLA induzierte die Aktivität bereits in geringen Konzentrationen deutlich. Vom Hauptisomer 9Z,11E-CLA war die 20fache Konzentration nötig, um vergleichbare Effekte zu erzielen. 100 μM 9Z,11E-CLA induzierten den *IAP*-Promotor um den Faktor 4,4, während bereits 5 μM 10E,12Z-CLA ausreichten, um eine Aktivierung vom Faktor 4,3 zu erzielen.

Die Retinsäure induzierte als bekannte Positivkontrolle die Differenzierung in den Caco-2 Zellen um den Faktor 9 und zeigte somit eine noch stärkere Potenz mit der Promotorregion der *IAP* zu interagieren als die konjugierten Linolsäureisomere.

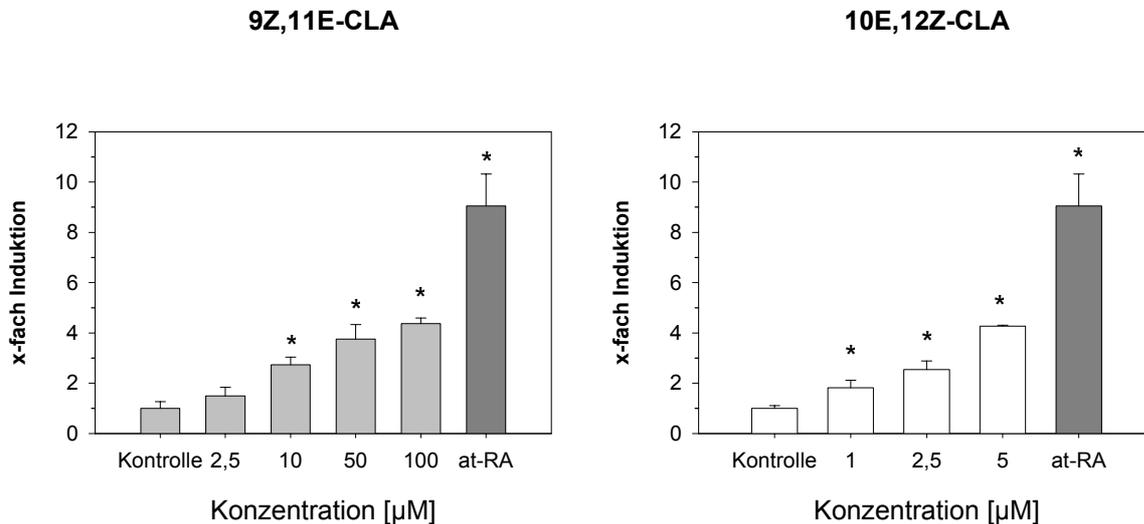


Abbildung 6-22: Promotoraktivität der *IAP* in Caco-2 Zellen nach konzentrationsabhängiger Induktion mit den CLA-Isomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=3$). Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P<0,05$) angegeben.

6.3.5.3 Reporterassays zur Bestimmung der Aktivität von *CEA*, *SI* und *iFABP* als Differenzierungsmarker in Caco-2 Zellen

Im ersten Teil dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Einfluss auf die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen nehmen können. Um diesen positiven Effekt der CLAs weiter zu untermauern, wurden im nächsten Schritt die Promotoraktivitäten der Differenzierungsgene *CEA*, *SI* und *iFABP* gemessen. Caco-2 Zellen wurden mit den jeweiligen Reporterplasmiden (Abschnitt 4.7.2) transfiziert und die Aktivitäten nach 24stündiger konzentrationsabhängiger CLA-Induktion mit dem Luciferaseassay bestimmt (Abschnitt 5.5.1). Bei allen Untersuchungen wurde 1 mM Valproinsäure (VPA) als Positivkontrolle eingesetzt.

Ergebnisse

CEA-Aktivierung

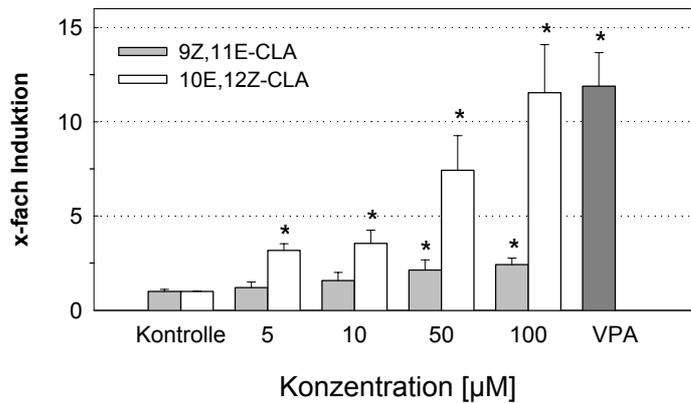


Abbildung 6-23: Vergleich der *CEA*-Aktivität (Carcinoembryonic antigen) in Caco-2 Zellen nach Induktion mit 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion der *CEA*-Aktivität relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

In Abbildung 6-23 war zu erkennen, dass beide Isomere mit dem Promotor des Differenzierungsmarkers *CEA* interagierten, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Nach einer Behandlung der Zellen mit 100 μ M 9Z,11E-CLA wurde *CEA* um den Faktor 2,4 induziert. Für eine vergleichbare Induktion mit dem 10E,12Z-CLA Isomer benötigte man < 5 μ M. Die Positivkontrolle aktivierte den Promotor um den Faktor 11,9 und war somit vergleichbar mit dem Effekt von 100 μ M des Minorisomers (Faktor 11,6).

SI-Aktivierung

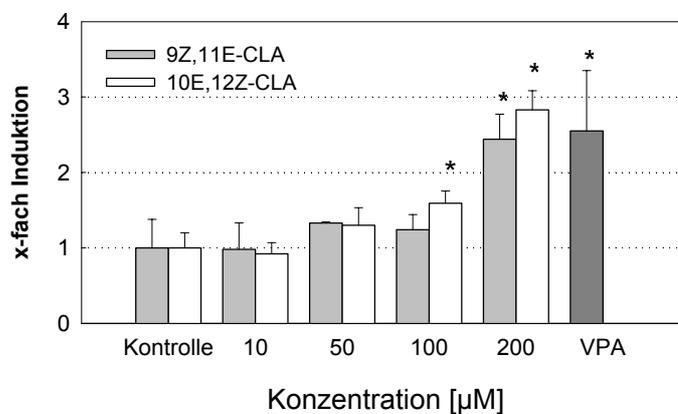


Abbildung 6-24: Aktivität der *SI* (Saccharase-Isomaltase) in Caco-2 Zellen nach Induktion mit den Isomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion der *SI*-Aktivität relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Bei der Untersuchung der Saccharase-Isomaltase Aktivität konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Interaktion der beiden CLA-Isomere mit dem Promotor festgestellt werden. Haupt- und Minorisomer der konjugierten Linolsäure unterschieden sich im Bezug auf diesen Differenzierungsmarker nicht wesentlich voneinander (Abb. 6-24). Festzustellen war aber auch hier, dass die Aktivierung des *SI*-Promotors durch die höchste Konzentration der Fettsäuren (200 μ M) mit der der Positivkontrolle VPA zu vergleichen war. Der letzte Differenzierungsmarker, das intestinale Fatty acid binding protein (*iFABP*), zeigte eine geringe Aktivierung durch die beiden Fettsäureisomere. Beide CLAs interagierten mit dem *iFABP*-Promotor konzentrationsabhängig, erreichten allerdings nicht die selbe Aktivität wie die Positivkontrolle VPA.

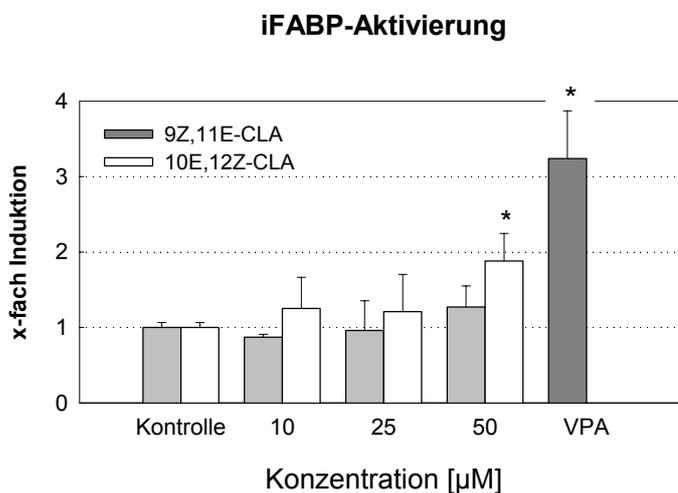


Abbildung 6-25: Aktivität des *iFABP* in Caco-2 Zellen nach Induktion mit den Isomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinate ist die Induktion der *iFABP*-Aktivität relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide konjugierten Linolsäureisomere antiproliferative Effekte aufweisen, die mit einer gleichzeitigen differenzierungsfördernden Wirkung korrelierten. Beim Vergleich der hier untersuchten Differenzierungsmarker war zu erkennen, dass die unterschiedliche Stärke mit dem die Promotorregionen aktiviert werden konnten, mit der Abstufung der Genregulation in spontan differenzierenden unbehandelten Caco-2 Zellen im Verlauf von 21 Tagen übereinstimmten [Mariadason et al., 2001]. Entscheidend war hier, dass die CLAs die sonst spontan auftretende Differenzierung der Caco-2 Zellen frühzeitig induzieren konnten. Bei der gesamten Differenzierungsstudie erwies sich das Minorisomer 10E,12Z-CLA wieder als potenter.

6.3.6 Der APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweg in der Kolonkarzinogenese

Das *apc*-Gen (adenomatous polyposis coli) spielt eine entscheidende Rolle während der Pathogenese des Kolonkarzinoms. Eine Mutation in diesem Gen führt zu einer Erhöhung der β -catenin Expression im Cytosol, da dieses Protein nur nach Bindung an APC abgebaut werden kann. β -catenin bildet mit dem T-Zellfaktor 4 (TCF-4) einen Komplex und kann auf diese Weise im Kern eine Reihe von Genen der Zellproliferation induzieren (siehe auch Kapitel 2.9). Da die konjugierten Linolsäureisomere 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation und Expression von Markergenen hatten, sowie mit den Promotorregionen von *c-myc* und *AP-1* interagieren konnten, sollte im folgenden Kapitel die Wirkung der CLAs auf den APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweg charakterisiert werden. In allen Versuchen wurden die bereits bekannten Caco-2 Kolonkarzinomzellen verwendet. Sie besitzen eine Mutation im *apc*-Gen und dienen zur Identifizierung molekularer Signalwege im Zellzyklus (Abschnitt 4.6).

6.3.6.1 Untersuchungen zur Aufklärung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges in Caco-2 Zellen

Für die Aufklärung dieser Signalkaskade wurde ein TCF-Reporterkonstrukt (pTOPFLASH, Abschnitt 4.7.2) als Grundplasmid in Caco-2 Zellen transfiziert. Es enthielt das Luciferasegen für den anschließenden Reporterassay. Um zu zeigen, dass das für die Messung der Luciferaseaktivität verantwortliche Konstrukt pTOPFLASH keinen Einfluss auf die APC- β -catenin-TCF-4 Signalkaskade hatte, wurde die mutierte Form dieses Konstruktes (pFOPFLASH, Abschnitt 4.7.2) als Kontrollplasmid ebenfalls transfiziert und gemessen. Keines der beiden Linolsäureisomere 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA hatte einen signifikanten Einfluss auf die Aktivitäten der Konstrukte (Abb. 6-26). Im Folgenden wurde pTOPFLASH bei allen Versuchen durchgehend als Reporterkonstrukt cotransfiziert. Da beide CLA-Isomere keinen Effekt auf die Reporter alleine ausübten, werden im weiteren Verlauf nur die Ergebnisse des potenteren Minorisomers 10E,12Z-CLA dargestellt.

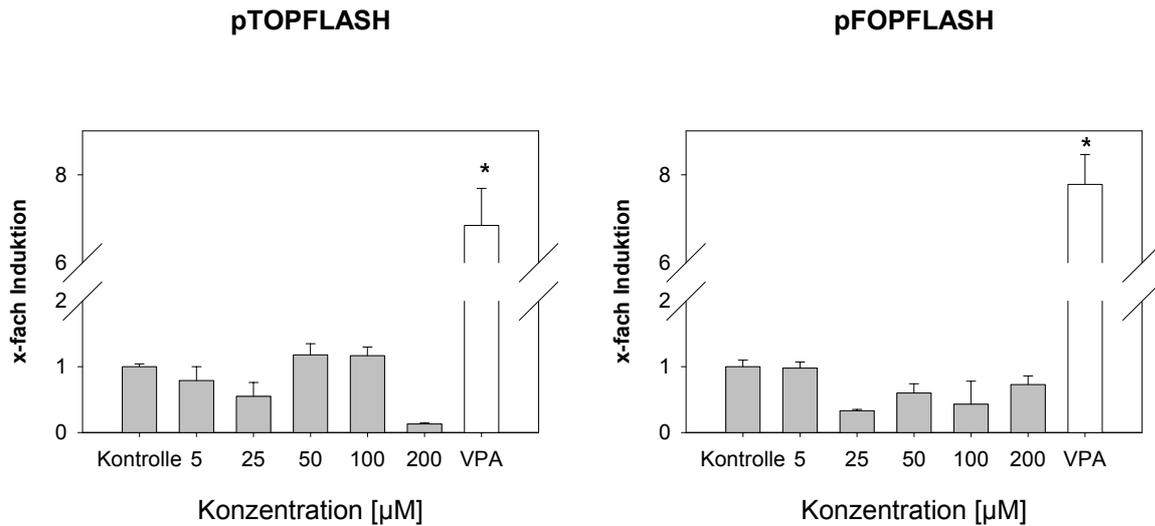


Abbildung 6-26: Vergleich der Reporterkonstrukte pTOPFLASH und pFOPFLASH nach Transfektion in Caco-2 wt Zellen. Auf der Ordinate ist die Induktion der Zellen nach konzentrationsabhängiger 10E,12Z-CLA Behandlung relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Zuerst sollte geklärt werden, welche Rolle β -catenin in der Signalkaskade zukommt. Hierzu wurden Cotransfektionen mit dem Reporterkonstrukt und β -catenin Plasmiden durchgeführt. Anschließend wurden die Caco-2 Zellen mit steigender Konzentration des potenteren CLA-Isomers behandelt. Nach 24 h erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität. Das pCi-neo-wt β -catenin Plasmid enthält eine Wildtyp- β -Catenin-Sequenz und wurde von 50 μM der 10E,12Z-CLA induziert. In Konzentrationen > 50 μM konnte eine Hemmung der β -catenin-Aktivität beobachtet werden, die allerdings nicht signifikant war. Nach einer Cotransfektion mit pFLAG-CMV-5/h β -cat Δ 45, welches eine mutierte Variante der β -catenin Sequenz enthält, wurde die Aktivität durch das Minorisomer konzentrationsabhängig gehemmt (Abb. 6-27).

Wenn unbehandelte Zellen miteinander verglichen wurden, war festzustellen, dass eine Mutation im β -catenin Gen eine deutlich erhöhte Grundaktivität im Gegensatz zum Wildtyp aufwies.

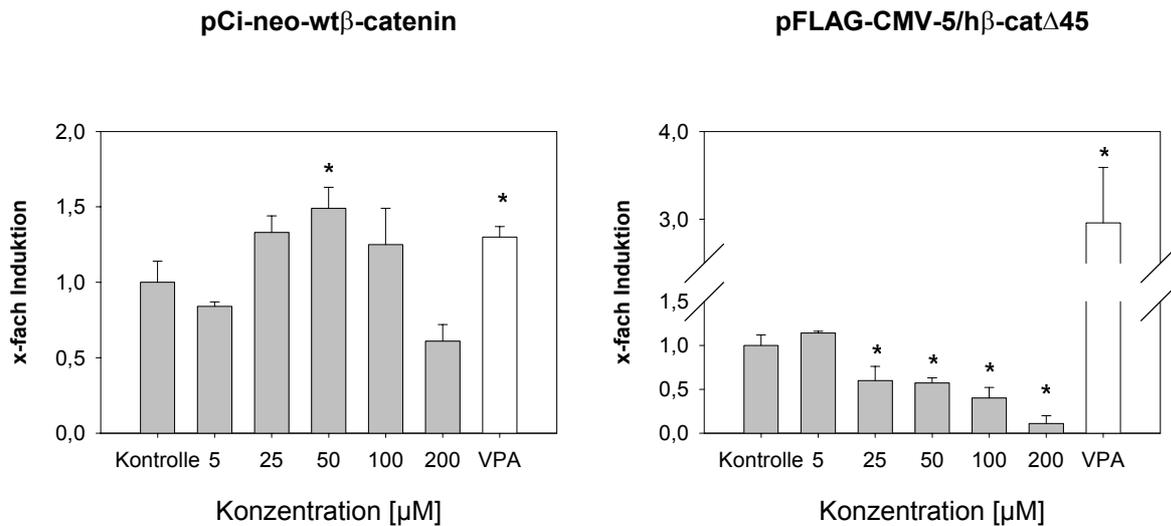


Abbildung 6-27: Reporterassays der mit 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen nach Transfektion der beiden β -catenin Konstrukte im Vergleich. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=6). Auf der Ordinatendachse ist jeweils die Induktion der Zellen relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P < 0,05$) angegeben.

Im nächsten Schritt wurde die Bedeutung der TCF-4 Komponente in der Signalkaskade untersucht. Hierzu wurden, wie mit den β -catenin Konstrukten zuvor auch, Cotransfektionen mit dem Reporterkonstrukt pTOPFLASH und pcDNA3.1-hTCF-4, der TCF-4 Wildtyp-Variante, bzw. dem pcDNA3.1- Δ N-hTCF-4 Plasmid, Deletionsmutante, nach dem gleichen Verfahren durchgeführt. 100 μ M des potenteren 10E,12Z-CLA Isomers induzierten das Wildtyp-TCF-4 Konstrukt um den Faktor 5,7 (Abb. 6-28). Nach Cotransfektion von pTOPFLASH mit der mutierten TCF-4 Variante lag die Aktivierung durch 50 μ M des Isomeres nur bei dem Faktor 1,6 (nicht signifikant). Wurden höhere Konzentrationen des Linolsäureisomeres eingesetzt, konnte in beiden Versuchen eine Hemmung der Luciferaseaktivität initiiert werden (Abb. 6-28).

Beide Wildtyp-Plasmide, pCi-neo-wt β -catenin und pcDNA3.1-hTCF-4, wurden in niedrigen Konzentrationen von der 10E,12Z-CLA induziert, bevor eine Hemmung im höheren Konzentrationsbereich eintrat. Bei den mutierten Plasmidkonstrukten, pFLAG-CMV-5/h β -cat Δ 45 und pcDNA3.1- Δ N-hTCF-4, war nur eine leichte Induktion im niedrigen molaren Bereich zu messen, bevor die konjugierte Linolsäure eine starke Hemmung bewirkte.

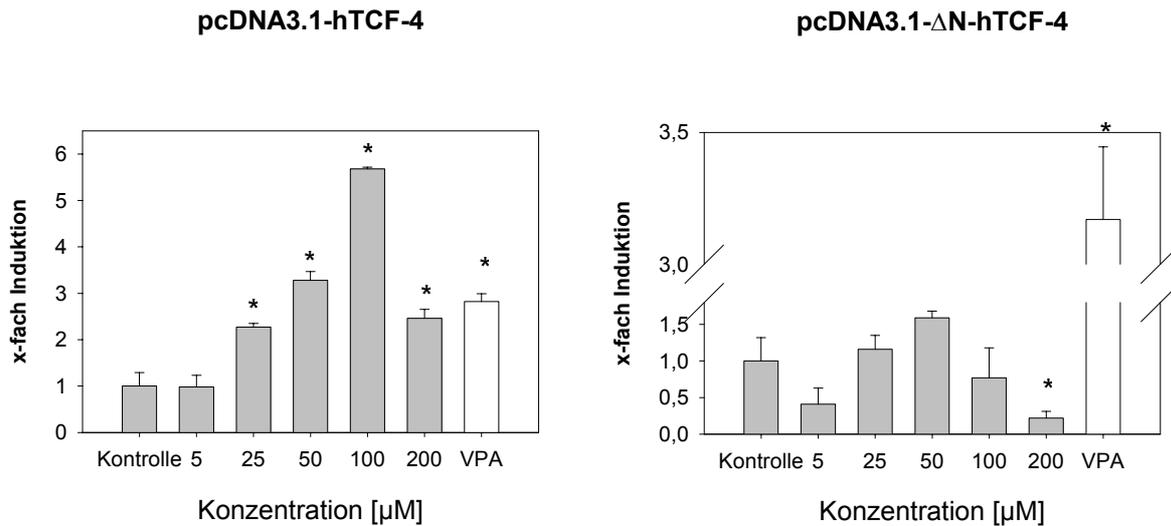


Abbildung 6-28: Unterschiede in der Aktivierung des TCF-4 wt Plasmides im Gegensatz zum mutierten TCF-4 Reporterkonstrukt in mit 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen nach Transfektion. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=6). Auf der Ordinatennachse ist jeweils die Induktion der Zellen relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Für weitere Analysen der APC- β -Catenin-TCF-4-Kaskade wurden im Folgenden Triple-Transfektionen durchgeführt. Hierzu wurde das Reporterkonstrukt pTOPFLASH mit Kombinationen der 4 vorher untersuchten Plasmide transfiziert. Um Vergleiche anstellen zu können, richteten sich die Behandlungen der Zellen, Inkubationszeiten, sowie Luciferaseaktivitätsmessungen für alle Versuche nach den vorherigen Angaben.

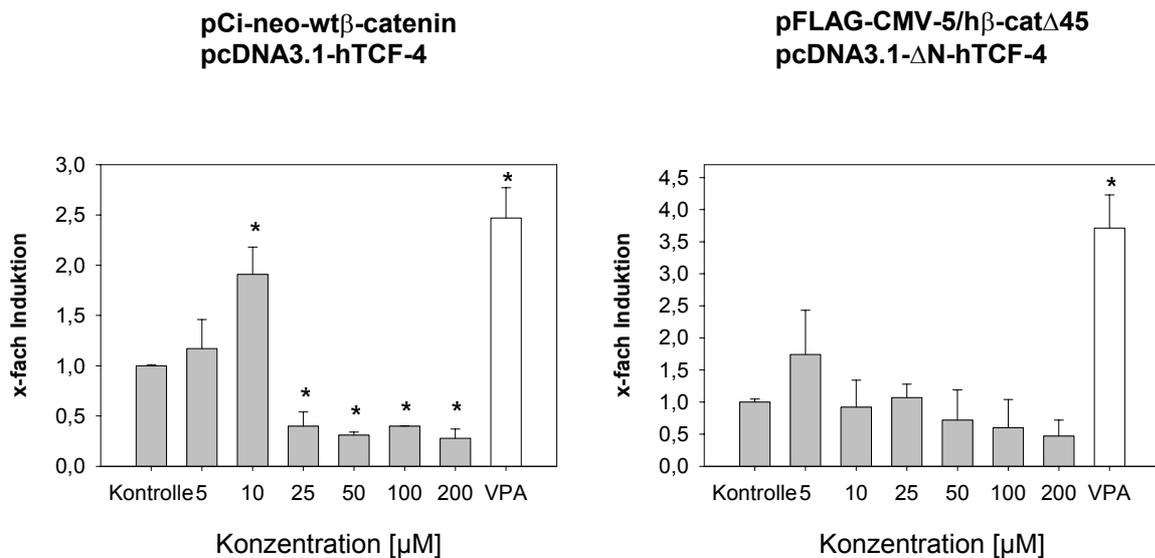


Abbildung 6-29: Inhibierung der Luciferaseaktivität durch das Minorisomer 10E,12Z-CLA nach Triple-Transfektion von pTOPFLASH mit den beiden wt bzw. mutierten β -Catenin und TCF-4 Konstrukten. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Inhibition relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Ergebnisse

Beim Betrachten der Triple-Transfektion mit den beiden Wildtyp-Plasmiden bestätigte sich die Tendenz der jeweiligen Cotransfektionen. 10 μM 10E,12Z-CLA zeigten eine leichte Induktion um den Faktor 1,9. Konzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ vermochten die Aktivität stark zu inhibieren. Das selbe konnte für die Analyse der beiden mutierten Plasmidvarianten (Abb. 6-29) vermutet werden. Die 10E,12Z-CLA hatte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Aktivität nach Triple-Transfektion von pTOPFLASH mit pFLAG-CMV-5/h β -cat Δ 45 und pcDNA3.1- Δ N-hTCF-4 zur Folge.

Um die Rolle von β -Catenin und TCF-4 weiter zu konkretisieren, wurden im letzten Schritt Triple-Transfektionen mit den jeweiligen Wildtyp-Plasmiden und Mutanten in Kombination durchgeführt. Versuchsaufbau und Durchführungen richteten sich wieder nach den vorherigen Angaben.

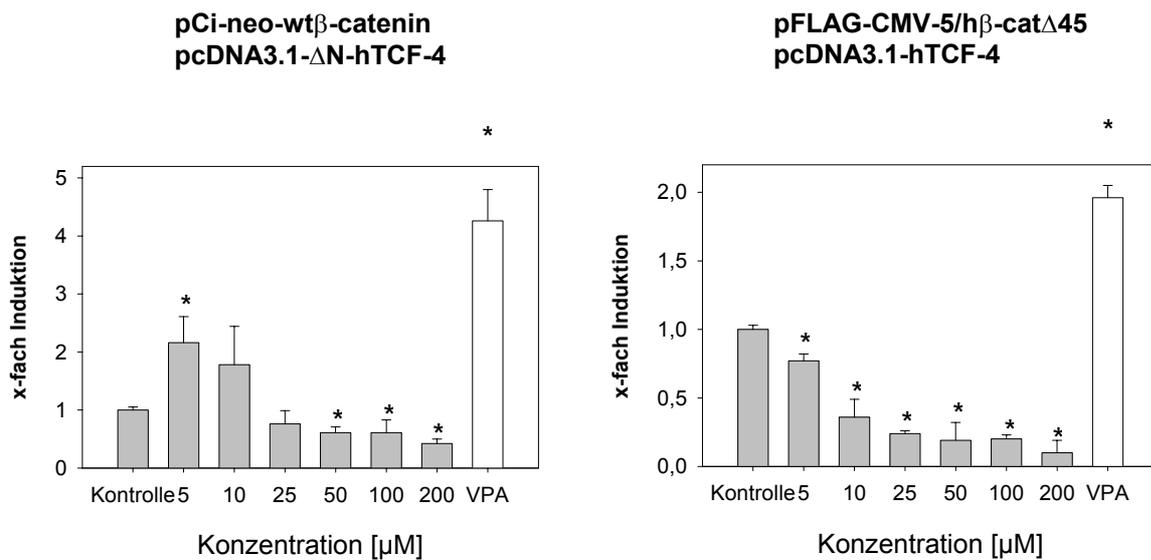


Abbildung 6-30: Inhibition durch das Minorisomer 10E,12Z-CLA nach Triple-Transfektion von pTOPFLASH mit dem Wildtyp- β -Catenin und dem mutierten TCF-4 Konstrukt. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=3$). Auf der Ordinatennachse ist die Inhibition relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P<0,05$) angegeben.

Auffällig war, dass bei der Triple-Transfektion des mutierten β -catenin Plasmides mit der Wildtyp-TCF-4 Variante eine sofortige Hemmung der Aktivität zu messen war. Umgekehrt zeigte das Wildtyp- β -catenin in Kombination mit dem mutierten TCF-4 Plasmid wieder eine leichte Induktion im niedrigen Konzentrationsbereich $\leq 10 \mu\text{M}$ 10E,12Z-CLA (Abb. 6-30).

Zusammenfassend lässt sich folgendes vermuten: Caco-2 Zellen haben ein mutiertes *apc*-Gen. Demnach erhöhte sich die Konzentration des β -catenins im Cytosol durch Transfektion des Wildtyp-Plasmids. Um den Abbau des Proteins zu bewirken, mussten hohe Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{M}$) der Fettsäure eingesetzt werden. Bei der vergleichenden Transfektion der mutierten β -catenin-Form entstand kein funktionsfähiger Komplex mit dem TCF-4 der Zelle, und das Plasmid wurde schon durch geringe CLA-Konzentrationen inhibiert. Bei der Transfektion des Wildtyp-TCF-4-Plasmids erhöhte sich deren Aktivität im Cytosol, und das in der Caco-2 Zelle vorhandene β -catenin konnte einen Komplex mit dem T-Zellfaktor 4 eingehen, woraufhin die Proliferation angeregt werden sollte. Erst 10E,12Z-CLA Konzentrationen über $100 \mu\text{M}$ hemmten die TCF-4 Aktivität. Die Effekte auf die mutierte TCF-4 Form waren in der Tendenz mit denen der mutierten β -catenin Variante vergleichbar.

Es ließ sich feststellen, dass dem β -catenin eine große Bedeutung in dieser Signalkaskade zukam, da sein Abbau zum einen vom *apc*-Gen abhängig war. Lag das β -catenin Protein erst einmal frei im Cytosol vor, war es darauf angewiesen, mit dem T-Zellfaktor 4 einen Komplex einzugehen. Nur so konnten weitere Gene der Proliferation initiiert werden. Je stärker also die β -catenin-TCF-4 Komplexbildung durch die einzelnen Plasmidvarianten in Kombination begünstigt wurde, je höhere 10E,12Z-CLA Konzentrationen mussten eingesetzt werden, um eine Hemmung der Luciferaseaktivitäten zu erreichen. Der Effekt der 10E,12Z-CLA bei der Triple-Transfektion der beiden Wildtyp-Plasmide korrelierte zusätzlich mit der proliferationshemmenden Eigenschaft dieser Fettsäure in Caco-2 Zellen. Da in dieser Studie eine Überexpression der Komponenten (β -catenin und TCF-4) für die Signalkaskade erzeugt wurde, lag die CLA-Konzentration für eine einsetzende Hemmung der Aktivität mit $> 10\mu\text{M}$ über der für die Proliferation berechnet wurde ($\text{IC}_{50} 3,1 \mu\text{M}$).

6.3.7 Effekte der Fettsäuren auf Marker der Zelladhäsion

Da Zelladhäsionsmoleküle in der Karzinogenese eine wichtige Funktion haben, sollten im nächsten Kapitel die Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf diese Marker studiert werden. Beta-catenin war bereits als wichtiger Marker der Zelladhäsion und als zentrales Bindeglied im APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweg bekannt. Um diese Bedeutung näher zu charakterisieren, wurde die *β -catenin* Expression in der Proliferationsphase von Kolonkarzinomzellen untersucht. Für diese Versuchsreihe wurden humane HT29 Zellen herangezogen. Dieses Modellsystem eignete sich hierfür am besten, weil HT29 Zellen eine homologe Mutation des *apc*-Gens (*apc*^{-/-}) besitzen und aus der TCF-Familie nur den Faktor 4 exprimieren. Auf diese natürliche Weise ist β -catenin im Cytosol verstärkt vorhanden und die Komplexbildung mit dem T-Zellfaktor 4 begünstigt. Gene der Proliferation, *c-myc*, *cylin D1* und *c-jun*, sowie das Targetgen *PPAR δ* werden in HT29 zeitabhängig induziert. Bisher konnte gezeigt werden, dass die mehrfach ungesättigten Fettsäuren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA eine Hemmung der Proliferation von Kolonkarzinomzellen bewirkten und die mRNA-Expression der Proliferationsmarker konzentrationsabhängig inhibiert wurde. Beides geht einher mit den aufgezeigten Effekten der CLAs auf die *PPAR δ* Aktivierung und mRNA-Expression. Im Folgenden sollte durch die Charakterisierung von β -catenin untersucht werden, inwieweit die konjugierten Linolsäureisomere ebenfalls Einfluss auf die Zelladhäsion von Kolonkarzinomzellen haben können.

6.3.7.1 Zeit- und konzentrationsabhängige β -catenin mRNA-Expressions in induzierten HT29 Zellen

Zunächst sollte ein Genexpressionsprofil von β -catenin in unbehandelten HT29 Zellen erstellt werden. Hierzu wurden die Zellen in großen Zellkulturflaschen ausgesät und nach diversen Zeitpunkten von 6 h bis 96 h geerntet. Die Gesamt-RNA wurde nach Chomczynski & Sacchi (Abschnitt 5.8.1) präpariert und die Transkriptmengen von β -catenin unter Verwendung der semiquantitativen RT-PCR-Methode (Abschnitt 5.8.6) bestimmt. Zur Standardisierung des Gens wurde, wie schon in Kapitel 6.3.3 erwähnt, das „housekeeping Gen“ β -actin herangezogen.

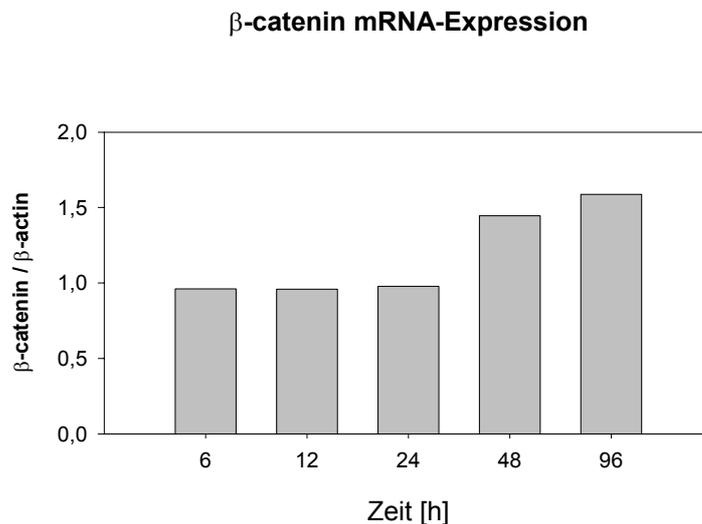


Abbildung 6-31: Zeitabhängige β -catenin mRNA-Expression in unbehandelten HT29 Zellen. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Zu erkennen war, dass die mRNA-Expression von β -catenin bis zu 96 h anstieg (Abb. 6-31). Um nun zu vergleichen, welchen Einfluss eine konzentrationsabhängige CLA-Behandlung auf das β -catenin Gen hatte, wurden HT29 Zellen mit steigender Konzentration der beiden Isomere behandelt. Die Zellernte erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten wie bei den unbehandelten Kontrollzellen. Gesamt-RNA Präparation, semiquantitative RT-PCR und densitometrische Auswertung der Transkriptmengen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse

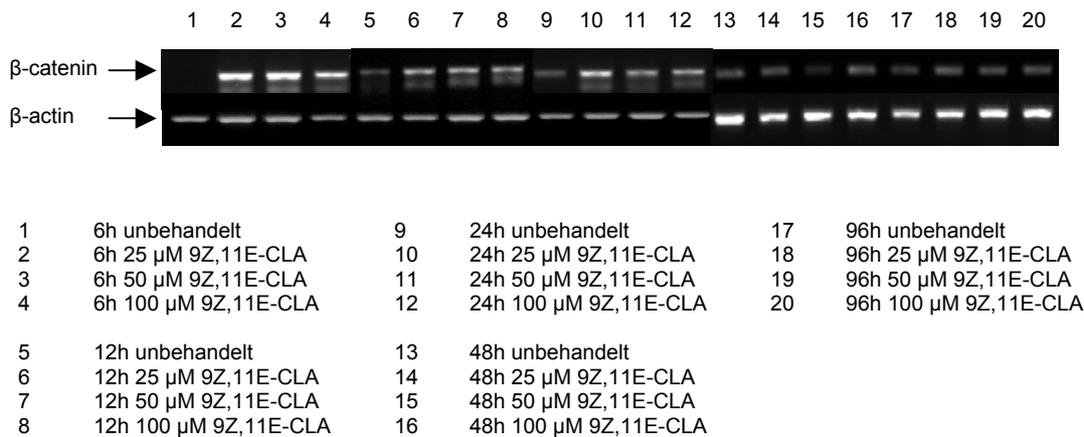


Abbildung 6-32: Konzentrationsabhängiger Effekt von 9Z,11E-CLA auf die β -catenin mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von n=3. Aufgrund der hohen Probenzahl wurden immer zwei Gele parallel gefahren (1-12 und 13-20).

Die Abbildungen 6-32 und 6-33 zeigen jeweils repräsentative Gele einer β -catenin PCR von mit 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA behandelten HT29 Zellen. Zur Standardisierung des Gens wurde β -actin herangezogen. Zu erkennen ist, dass die Transkriptmengen von β -catenin konzentrationsabhängig abnahmen. Dies galt für den Verlauf innerhalb eines Zeitpunktes, wie auch für den Effekt einer Konzentration im Zeitverlauf von 6 h – 96 h. Weiterhin war zu vermuten, dass das Minorisomer 10E,12Z-CLA einen stärkeren Effekt auf das Gen hatte und die β -catenin mRNA-Expression früher und in geringeren Konzentrationen hemmen konnte. Das Minorisomer schien auch hier potenter als das Hauptisomer 9Z,11E-CLA.

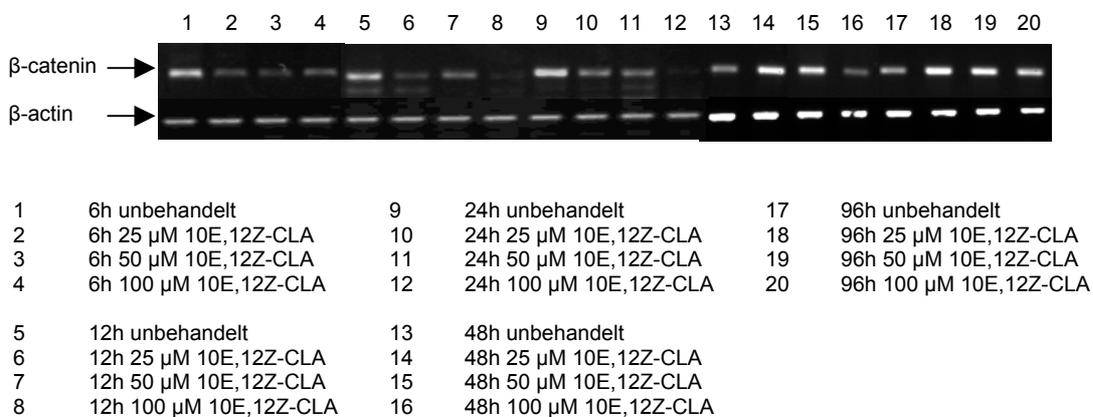


Abbildung 6-33: Konzentrationsabhängiger Effekt von 10E,12Z-CLA auf die β -catenin mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von n=3. Aufgrund der hohen Probenzahl wurden immer zwei Gele parallel gefahren (1-12 und 13-20).

Ergebnisse

In Abbildung 6-34 sind die densitometrischen Auswertungen der β -catenin-Transkriptmengen gezeigt. Im direkten Vergleich am Beispiel der 100 μ M Behandlungen ist zu erkennen, dass beide Isomere eine deutliche Hemmung der β -catenin Expression zur Folge hatten. Diese Inhibition war zeitabhängig und beim Minorisomer 10E,12Z-CLA stärker.

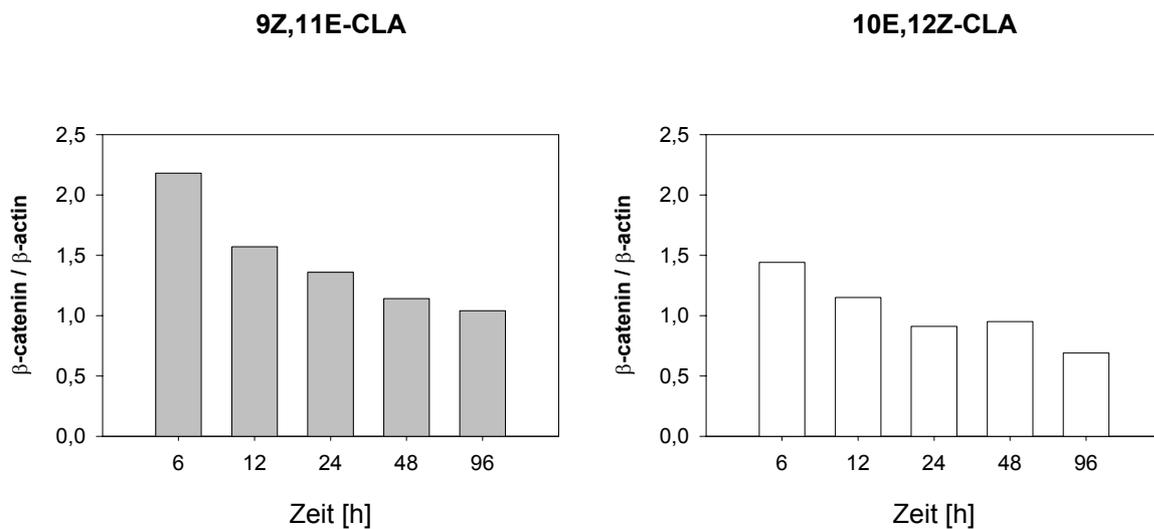


Abbildung 6-34: Vergleich der zeitabhängige β -catenin mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Behandlung mit je 100 μ M der CLA-Isomere. Gezeigt ist die Auswertung repräsentativer Gele. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf der Ordinatennachse ist die Induktion des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die konjugierten Linolsäureisomere einen direkten Einfluss auf die Genexpression des Zelladhäsionsmoleküls β -catenin zeigten. Diese Hemmung war konzentrationsabhängig. Weiterhin wurde die β -catenin mRNA-Expression in der Hauptphase der Proliferation (bis 96 h) inhibiert. Die Potenz des Minorisomers korrelierte mit den bereits ermittelten Daten der Proliferation und Differenzierung.

6.3.7.2 Effekte der konjugierten Linolsäureisomere auf das β -Catenin Protein in HT29 Zellen

Auf Genexpressionebene konnte gezeigt werden, dass die CLAs einen direkten Einfluss auf β -catenin ausüben konnten. Da β -catenin jedoch auch posttranskriptional reguliert wird, sollten im Folgenden Western Blots unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Für die Analyse des β -Catenin Proteins wurden HT29 Zellen konzentrations- und zeitabhängig mit den beiden CLA-Isomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA behandelt. Nach Präparation des Gesamtzelllysates (Abschnitt 5.9.4) und Proteinbestimmung wurden 30 μ g/Probe auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das Protein hat eine Größe von 92 kDa und wurde mit dem Antikörper Catenin-beta Ab-1 (1:4000, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland) detektiert und mittels des ECL Detection System (Amersham, Braunschweig, Deutschland) ausgewertet. In Abbildung 6-35 ist zu erkennen, dass die β -Catenin Protein Expression von dem Hauptisomer 9Z,11E-CLA konzentrations- und zeitabhängig inhibiert wurde.

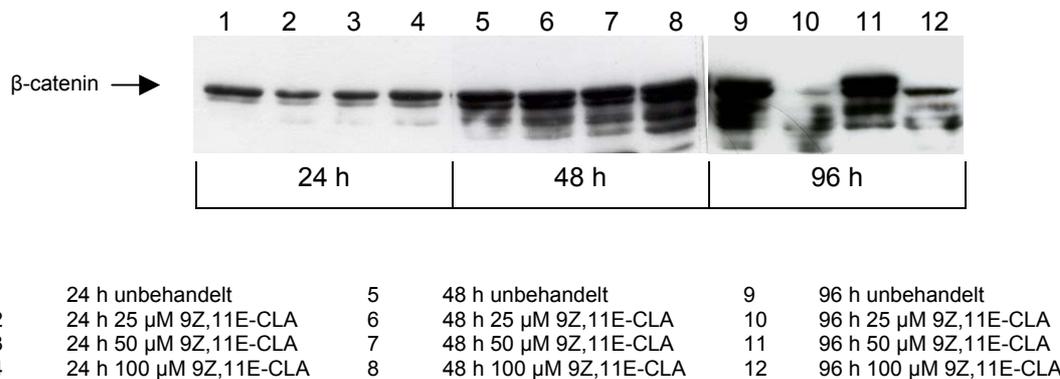


Abbildung 6-35: Zeit- und konzentrationsabhängiger β -Catenin Abbau durch das Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von n=3. Der β -Catenin Abbau zeigt sich durch die zunehmend auftretenden Banden.

Ergebnisse

Auch das Minorisomer 10E,12Z-CLA hatte einen inhibierenden Effekt auf das β -Catenin Protein in Abhängigkeit der Konzentration und Zeit (Abb. 6-36). Anhand der Blots wurde ebenfalls deutlich, dass diese Fettsäure potenter war als das Hauptisomer 9Z,11E-CLA.

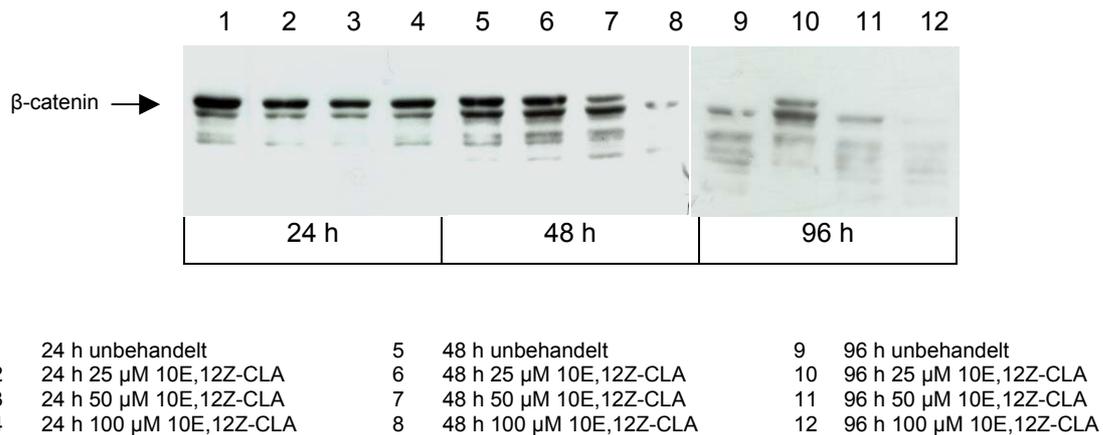


Abbildung 6-36: Zeit- und konzentrationsabhängiger β -Catenin Abbau durch das Minorisomer 10E,12Z-CLA. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von n=3. Aufgrund der Probenanzahl wurden immer zwei Blots parallel durchgeführt (Nr. 1–8 und Nr. 9–12).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide CLAs einen Abbau des β -Catenin Proteins in der Zelle bewirkten. Dies weist darauf hin, dass Zelladhäsionsmoleküle, wie β -Catenin, von mehrfach ungesättigten Fettsäuren beeinflusst werden könnten und korreliert ebenfalls mit der Hemmung der Genexpression von *β -catenin* durch CLAs.

6.4 Konjugierte Linolsäureisomere und die Rolle von PPAR δ

Bekannt war, dass PPAR δ ein Haupttarget des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges ist und vermutlich direkt etwas mit der Entwicklung von Kolonkrebs zu tun haben könnte. Da bereits gezeigt wurde, dass die Eliminierung des *PPAR δ* Gens einen Rückgang von Tumoren des Kolons zur Folge hatte [Park et al., 2001], sollten als nächstes stabile Klone generiert werden, die *hPPAR δ* überexprimierten oder reprimierten. Für diesen Zweck wurden Caco-2 Zellen stabil mit pcDNA3.1-hPPAR δ bzw. pcDNA3.1-hPPAR δ DN mittels Metafectene transfiziert (Abschnitt 5.4.2). Das hPPAR δ DN Plasmid enthält eine inaktive PPAR δ Mutante. Sie ist noch in der Lage, Liganden zu binden, hat aber durch die verlorene Eigenschaft, Co-Repressoren zu übertragen, keine Transkriptionsaktivität mehr. Durch den Vergleich der möglichen Expressionen *hPPAR δ* überexprimierender und reprimierender Caco-2 Klone mit normalen Caco-2 Zellen sollten Zielgene der Signaltransduktion identifiziert werden.

6.4.1 Generierung von Caco-2 Zellklonen, die hPPAR δ überexprimieren bzw. die hPPAR δ Expression reprimieren

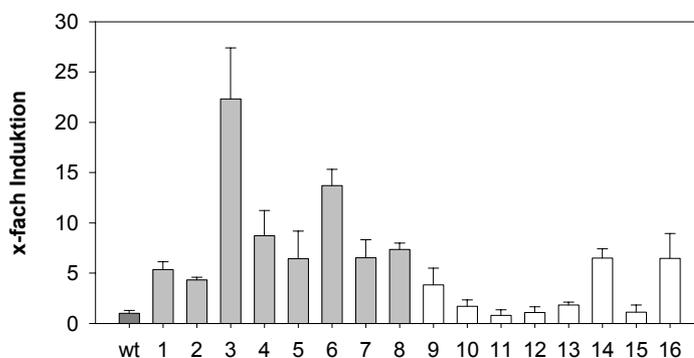
Um stabile Klone zu erzeugen, die *hPPAR δ* überexprimieren bzw. reprimieren, wurden die Plasmide pcDNA3.1-hPPAR δ bzw. pcDNA3.1-hPPAR δ DN mit dem Transfektionsreagenz METAFECTENETM für Säugerzellen nach Angaben des Herstellers in Caco-2 Zellen transfiziert (Abschnitt 5.4.2). Nach einer Selektion der Caco-2 Zellen mit 500 μ g/ml G418 wurden jeweils 8 Klone aus jeder Gruppe vermehrt und auf ihre Stabilität hin überprüft.

6.4.2 Nachweis zur stabilen Transfektion von Caco-2 Klonen

6.4.2.1 Transfektionen mit PPRE zum Nachweis der Stabilität von Caco-2 *hPPAR δ* überexprimierenden und reprimierenden Klonen

Zum Nachweis der *hPPAR δ* -Aktivität der einzelnen Klone wurden diese mit dem Plasmid pPPRE-TK-Luc transient transfiziert. Das Plasmid enthält ein Peroxisomen Proliferator aktiviertes Response Element (PPRE), einen Thymidinkinase-Promotor (TK) und das Gen für die Luciferase (Luc), das für den anschließenden Reporterassay benötigt wird. Je mehr *hPPAR δ* in den einzelnen Caco-2 Klonen exprimiert wird, umso höher sollte die gemessene Luciferaseaktivität des Plasmides liegen. Alle 16 Caco-2 Klone und Caco-2 wt Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und anschließend mit 0,5 μ g / Well pPPRE-TK-Luc transfiziert (Abschnitt 5.4.1). Nach 24 h wurde die Aktivität mit dem Luciferasereporterassay bestimmt.

PPRE-Aktivierung



wt	Caco-2 wt Zellen			
1	Caco-2 <i>hPPARδ</i> +/+ Klon 1	9	Caco-2 <i>hPPARδ</i> DN Klon 1	<i>hPPARδ</i> +/+ Klone
2	Caco-2 <i>hPPARδ</i> +/+ Klon 2	10	Caco-2 <i>hPPARδ</i> DN Klon 2	<i>hPPARδ</i> -/- Klone
3	Caco-2 <i>hPPARδ</i> +/+ Klon 3	11	Caco-2 <i>hPPARδ</i> DN Klon 3	
4	Caco-2 <i>hPPARδ</i> +/+ Klon 4	12	Caco-2 <i>hPPARδ</i> DN Klon 4	
5	Caco-2 <i>hPPARδ</i> +/+ Klon 5	13	Caco-2 <i>hPPARδ</i> DN Klon 5	
6	Caco-2 <i>hPPARδ</i> +/+ Klon 6	14	Caco-2 <i>hPPARδ</i> DN Klon 6	
7	Caco-2 <i>hPPARδ</i> +/+ Klon 7	15	Caco-2 <i>hPPARδ</i> DN Klon 7	
8	Caco-2 <i>hPPARδ</i> +/+ Klon 8	16	Caco-2 <i>hPPARδ</i> DN Klon 8	

Abbildung 6-37: PPRE-Aktivität der Caco-2 Klone. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=4). Auf der Ordinatenaachse ist die Induktion des Rezeptors der Klone relativ zu Caco-2 wt Kontrollzellen angegeben.

Zu erkennen ist, dass die Caco-2 hPPAR δ überexprimierenden Klone 1 – 8 alle eine höhere Aktivität besaßen als die Caco-2 wt Zellen. Die Induktion der hPPAR δ positiven Klone variierte zwischen dem Faktor 4,3 und 13,7. Klon Nr. 3 zeigte in allen durchgeführten Transfektionen die stärkste Aktivität im Bezug auf hPPAR δ . Bei den 8 untersuchten Caco-2 hPPAR δ reprimierenden Klone war zu erkennen, dass eine leichte Grundaktivität des Plasmides gemessen werden konnte. Sie variierte zwischen 1 und 3,8. Klon 6 und 8 hatten Aktivitäten vom Faktor 6. Wie zu erwarten war, konnte hPPAR δ mit der Transfektionsmethode der mutierten Rezeptorform nicht vollständig eliminiert werden. PPARdelta war noch in den Zellen vorhanden, sollte allerdings keine Funktion mehr ausüben können (Abschnitt 4.7.1).

6.4.2.2 Nachweis von hPPAR δ in stabilen Caco-2 Klone auf Proteinebene

Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor in Caco-2 hPPAR δ überexprimierenden Klone erfolgreich transfiziert wurde. Da allerdings auch die reprimierenden Klone eine leichte Grundaktivität aufwiesen, sollte im nächsten Abschnitt das PPAR δ Protein untersucht werden. Hierzu wurden von allen 16 Klone Kernextrakte präpariert und die Proteine (5 μ g / Probe) anschließend in einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt (Abschnitt 5.9). Nach Blotting der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran und Blockieren der Membran mit 5 % Milchpulver wurde das PPAR δ Protein mit dem Antikörper PPAR β (H-74): sc-7197 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) bei 4° C über Nacht detektiert. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag mit dem ECL Detection System (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Um Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden ebenfalls nach der gleichen Methode verschiedene Zelllinien auf ihre PPAR δ Proteinexpression hin charakterisiert. Shimada et al. (2002) konnten bereits die PPAR-Expressionen in unterschiedlichen Zelllinien im Western Blot zeigen. Klar wurde, dass HT29 Zellen PPAR δ stärker exprimierten als Caco-2 Zellen. Abbildung 6-38 vergleicht die Expression des PPAR δ Proteins in den verschiedenen Zelllinien HCT116 -/-, HCT116 +/-, HT29 und Caco-2 miteinander.

Ergebnisse

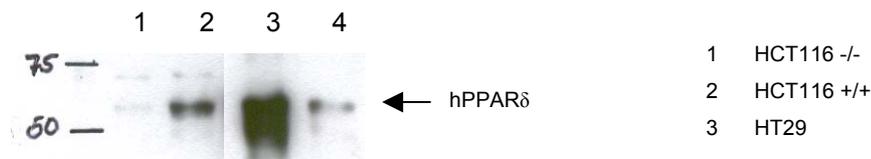


Abbildung 6-38: Vergleich der Proteinexpression von PPAR δ in verschiedenen Zelllinien. Gezeigt sind repräsentative Western Blots.

In Abbildung 6-39 sind die PPAR δ Expressionsmuster der 16 Caco-2 Klone dargestellt. Auch auf Proteinebene wurde deutlich, dass der Klon Nr. 3 der Rezeptor-überexprimierenden Caco-2 Zellen von allen 8 positiven Klonen die stärkste PPAR δ -Expression zeigte. Die PPAR δ -reprimierenden Caco-2 Klone wiesen im Western Blot eine leichte Proteinexpression auf. Die Korrelation zwischen PPRE-Aktivierung und Proteinexpression machte deutlich, dass eine völlige Eliminierung des Rezeptors durch Transfektionen eines mutierten PPAR δ Elementes nicht erreicht werden konnte. Beim Vergleich der beiden PPAR δ -Nachweismethoden wurde festgestellt, dass der Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon Nr. 3 und der Caco-2 hPPAR δ DN Klon Nr. 7 die jeweiligen Rezeptor-überexprimierenden bzw. -reprimierenden Zelllinien am besten charakterisierten. Im Folgenden wurden +/+ Klone 3 und DN Klon 7 für alle Versuche verwendet und miteinander verglichen.

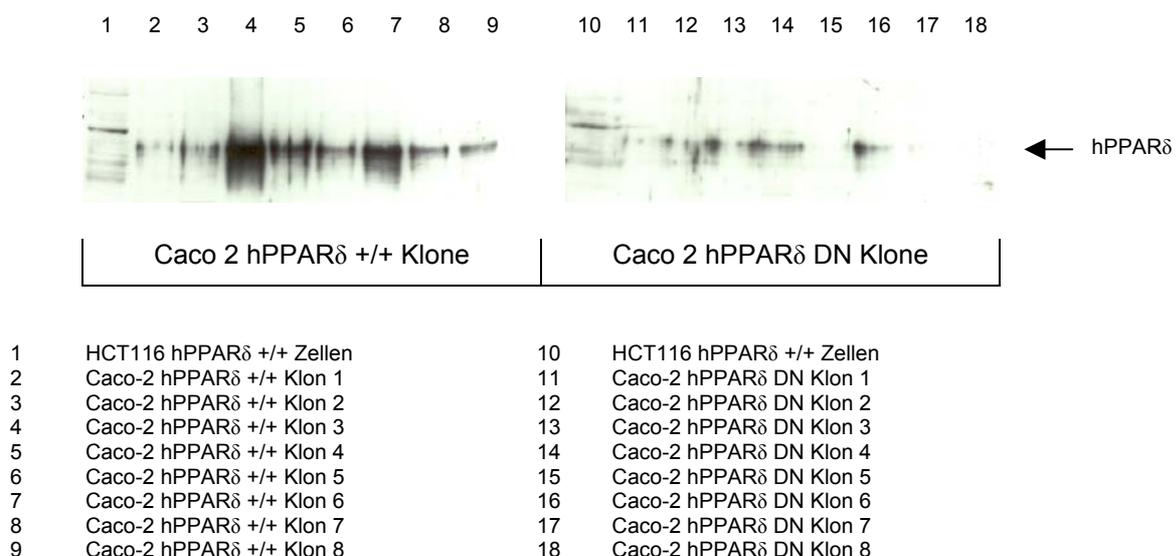


Abbildung 6-39: Vergleich der Proteinexpression von PPAR δ in Caco-2 Klonen. Gezeigt sind repräsentative Western Blots von n=3.

6.4.3 Vergleichende Proliferationsstudien der hPPAR δ Caco-2 Klone

6.4.3.1 Proliferationsverlauf der stabil transfizierten Caco-2 Klone nach CLA-Behandlung zur Untersuchung der Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ

Um die Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ in der Kolonkarzinogenese genauer zu charakterisieren, wurden Caco-2 PPAR δ -überexprimierende (+/+ Klon 3) und reprimierende (DN Klon 7) Klone im Bezug auf die Proliferation parallel untersucht. Beide Klone wurden nach Aussaat 3 Tage in Konzentrationsabhängigkeit mit den 9Z,11E-CLA und 10E,12Z-CLA Isomeren behandelt. Im Anschluss daran erfolgte die photometrische Bestimmung der Stoffwechselaktivität der Zellen.

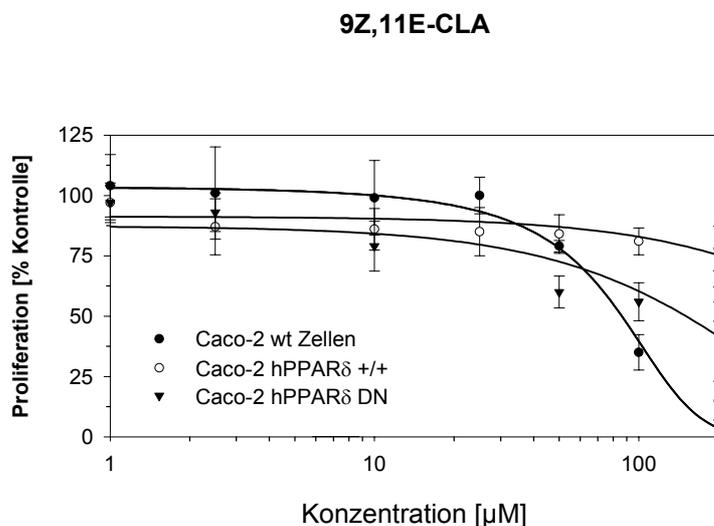


Abbildung 6-40: Proliferation der Caco-2 Klone +/+ Klon 3 und DN Klon 7 nach Behandlung mit dem Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatennachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Alle Werte ab 79 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar (P<0,05).

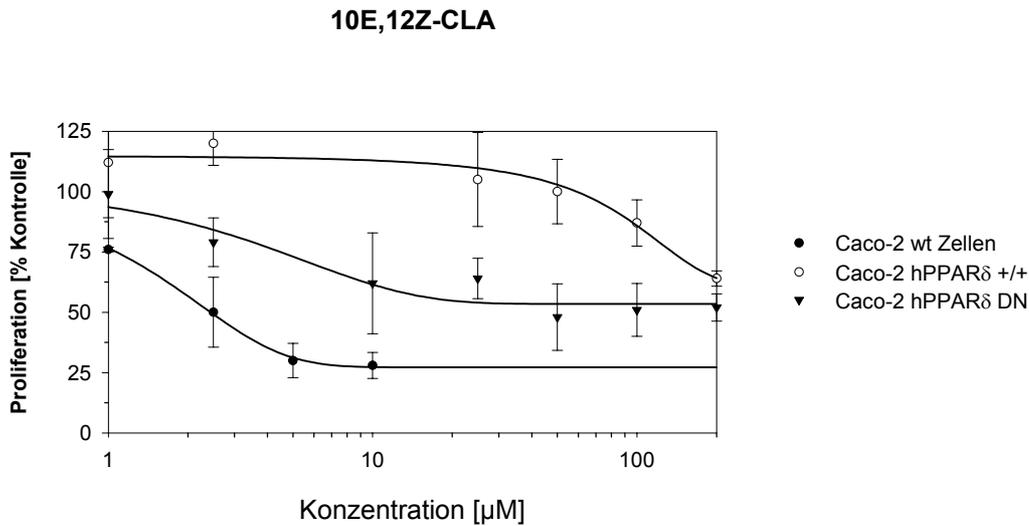


Abbildung 6-41: Proliferation der Caco-2 Klone +/+ Klon 3 und DN Klon 7 nach Behandlung mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Alle Werte ab 64 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar ($P < 0,05$).

Beim Vergleich der beiden Klone wurde sichtbar, dass die Inhibition der Zellen unter Einfluss von PPAR δ höherer CLA-Konzentrationen bedarf. Das 10E,12Z-CLA Isomer war hierbei wieder potenter als das biologische Hauptisomer. Interessant war zu sehen, dass das Minorisomer in geringen Konzentrationen die Caco-2 hPPAR δ +/+ Zelllinie zur Proliferation anregte und erst bei Konzentrationen $> 50 \mu\text{M}$ eine Inhibition bewirkte. In Tabelle 6-4 sind die Konzentrationen für die halbmaximale Wachstumshemmung der einzelnen CLA-Isomere in den unterschiedlichen Caco-2 hPPAR δ Klonen vergleichend dargestellt.

Tabelle 6-4: IC₅₀ Werte der Proliferationshemmung von Caco-2 Klonen.

	9Z,11E-CLA	10E,12Z-CLA
Caco-2 hPPAR δ +/+ (Klon 3)	872,6 μM	261,8 μM
Caco-2 hPPAR δ DN (Klon 7)	171,1 μM	44,1 μM

6.4.3.2 Untersuchungen zur Genexpression von Proliferationsgenen in Caco-2 Klonen unter Berücksichtigung konzentrationsabhängiger CLA-Behandlung

Um zu untersuchen, ob eine Hemmung der Proliferation von Caco-2 wt Zellen und PPAR δ -Klonen durch CLAs (Abschnitt 6.4.3.1) mit der Inhibition der Expression verschiedener Gene der Proliferation korreliert, wurden im Folgenden Markergene der Proliferation in den selben Zelllinien charakterisiert. Hierzu wurden Expressionsprofile der Gene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* in der Proliferationsphase von unbehandelten und mit 5 μ M des potenteren Minorisomers 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen und -Klonen im Zeitverlauf von 12 h bis 96 h erstellt (Abb. 6-42). Nach Ernte der jeweiligen Zellen wurde die Gesamt-RNA mit Trizol (Abschnitt 5.8.2) präpariert und die Transkriptmengen der jeweiligen Gene unter Verwendung der semiquantitativen RT-PCR-Methode (Abschnitt 5.8.6) bestimmt. Zur Standardisierung der Zielgene wurde, wie schon in Kapitel 6.3.3 erwähnt, das „housekeeping Gen“ *β -actin* herangezogen.

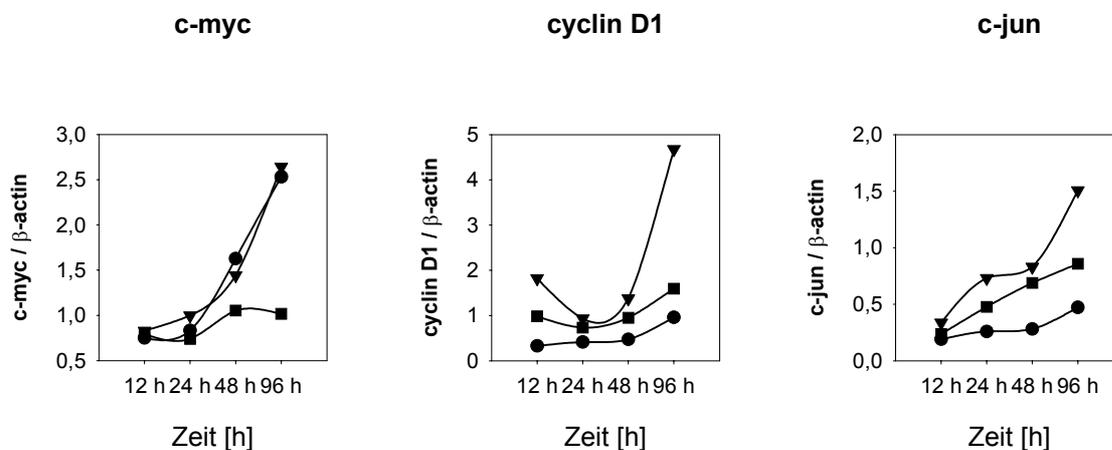


Abbildung 6-42: Vergleich der mRNA-Expression von Markergenen der Proliferation in unbehandelten Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ Klonen (▼ +/+ Klon 3, ■ DN Klon 7, ● wt). Gezeigt sind jeweils die densitometrischen Auswertungen repräsentativer Gele von drei unabhängigen Experimenten. Auf den Ordinatenachsen ist die Ratio des Gens im Bezug auf *β -actin* relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

In Abbildung 6-42 ist zu erkennen, dass die drei Proliferationsmarker in allen unbehandelten Zelllinien zeitabhängig exprimiert wurden. Caco-2 hPPAR δ +/+ Zellen zeigten höhere Transkriptmengen als die vergleichenden reprimierenden bzw. wt Zellen. Weiterhin war die Expression der Proliferationsgene in den Caco-2 wt Zellen meistens am niedrigsten. In Kapitel 6.4.2 konnte bereits gezeigt werden, dass die

stabilen Caco-2 hPPAR δ DN Klone keinen vollständigen Knockout des Rezeptors zur Folge hatten. Sie zeigten im Bezug auf den Wildtyp noch eine geringe Expression des Rezeptors, der aber deutlich unter der Aktivität der überexprimierenden Klone lag. Für die weitere Charakterisierung des Einflusses von PPAR δ in der Proliferationsphase von Caco-2 Zellen, sollten nur die veränderten Klone (+/+ Klon 3, DN Klon 7) miteinander verglichen werden.

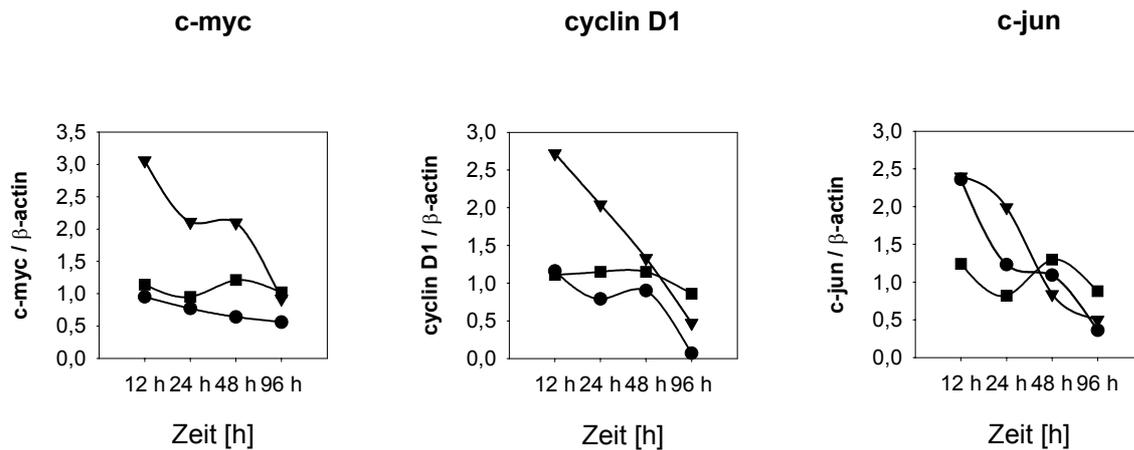


Abbildung 6-43: Zeitabhängiger Vergleich der Genexpressionsprofile von mit 5 μ M 10E,12Z-CLA behandelter Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ Klonen (\blacktriangledown +/+ Klon 3, \blacksquare DN Klon 7, \bullet wt). Gezeigt sind jeweils die densitometrischen Auswertungen repräsentativer Gele von drei unabhängigen Experimenten. Auf den Ordinatenachsen ist die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

Die erstellten Genexpressionsprofile der Proliferationsmarker machten deutlich, dass alle Gene in der ersten Phase des Wachstums von Caco-2 hPPAR δ +/+ Zellen durch den Einfluss der CLA verstärkt induziert wurden. Mit zunehmender Zeit trat allerdings die Hemmung der mRNA-Expressionen ein. Beim Vergleich der beiden überexprimierenden und reprimierenden Klone ist zu erkennen, dass auch hier die Transkriptmengen der jeweiligen Gene bei den hPPAR δ DN Proben generell unter denen der hPPAR δ +/+ lagen. Eine Korrelation zwischen den Effekten der konjugierten Linolsäureisomere im Bezug auf die Proliferationshemmung von Kolonkarzinomzellen und den entsprechenden Expressionsprofilen der Gene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* konnte hergestellt werden. Weiterhin war eine Übereinstimmung zwischen den Caco-2 hPPAR δ +/+ und DN Klonen im Wachstumsverhalten und der Genexpression zu erkennen. Sobald der Rezeptor in der Proliferationsphase verstärkt vorhanden war, wurden höhere CLA-Konzentrationen benötigt, um die gleichen Effekte hervorzurufen.

6.4.4 Die Rolle von PPAR δ in der Differenzierungsphase von mit 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA induzierten Caco-2 Zellen

Für diese Studie wurden die PPAR δ - überexprimierenden und -reprimierenden Klone mit dem Promotor der Intestinalen Alkalischen Phosphatase transfiziert. Nach einer 24stündigen Behandlung der Zellen mit den beiden CLA-Isomeren wurde die Promotoraktivität mittels Luciferase gemessen. Die Induktion des Promotors für die Differenzierung war in PPAR δ -überexprimierenden Zellen stärker als in den reprimierenden Klonen. Deutlich wurde auch, dass das Hauptisomer eine geringere Potenz zur Differenzierung zeigte. In Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 Zellen induzierten 50 μ M 9Z,11E-CLA den *IAP*-Promotor um den Faktor 4,7. Bei dem Minorisomer aktivierten bereits 5 μ M die +/+ Zellen um den Faktor 5,7. Der hPPAR δ reprimierende Klon 7 differenzierte nicht so stark. Beim Vergleich der beiden Isomere in diesen Zellen, konnte erkannt werden, dass 10 μ M 10E,12Z-CLA den Promotor um den Faktor 1,7 aktivierte und die 10fache Konzentration (100 μ M) 9Z,11E-CLA für den selben Effekt (Faktor 1,8) benötigt wurden.

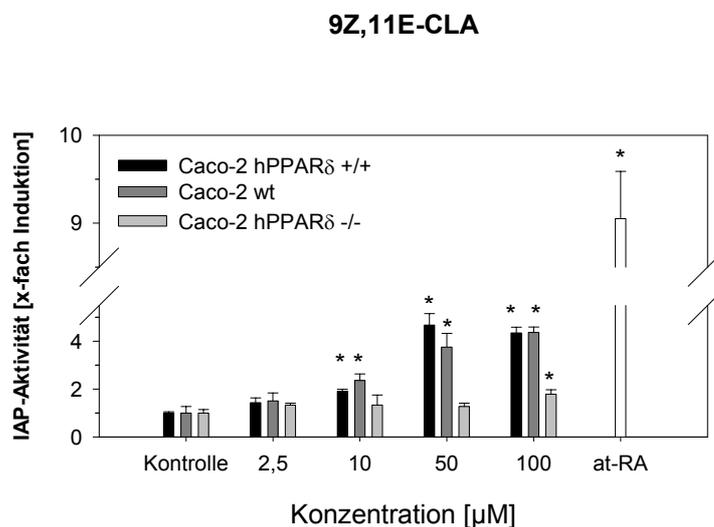


Abbildung 6-44: Promotoraktivität der *IAP* in PPAR δ -überexprimierenden (+/+ Klon 3) und -reprimierenden (DN Klon 7) Caco-2 Klonen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nach Induktion mit dem Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

10E,12Z-CLA

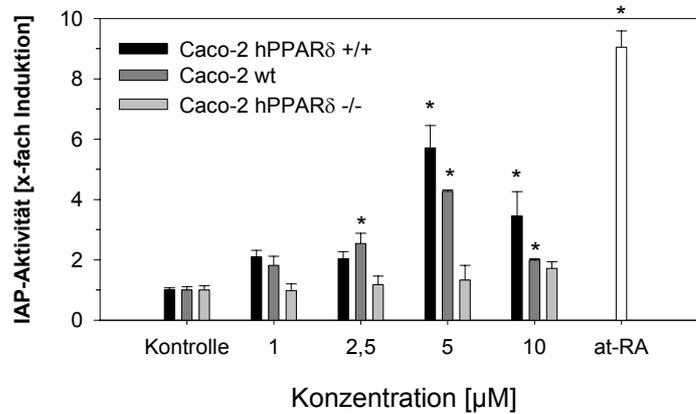


Abbildung 6-45: Promotoraktivität der *IAP* in PPAR δ -überexprimierenden (+/+ Klon 3) und -reprimierenden (DN Klon 7) Caco-2 Klonen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nach Induktion mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PPAR δ einen Einfluss auf die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen hatte. Beide CLA-Isomere induzierten die *IAP*-Promotoraktivität in PPAR δ -überexprimierenden Caco-2 Klon 3 Zellen stärker als in DN Klon 7 oder Caco-2 Wildtyp-Zellen. Weiterhin war das Minorisomer 10E,12Z-CLA potenter als das biologische Hauptisomer 9Z,11E-CLA.

6.4.5 Einfluss des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors PPAR δ auf die Zelladhäsion von Kolonkarzinomzellen

Die Adhäsion von Zellen spielt eine wichtige Rolle während der Kolonkarzinogenese (Abschnitt 2.9). β -Catenin bildet in diesem Zusammenhang ein wichtiges Bindeglied in der APC- β -Catenin-TCF-4 Signalkaskade und ist somit auch in der Lage, PPAR δ zu induzieren. Zur genaueren Aufklärung der Rolle von PPAR δ im Bezug auf die Zelladhäsionsfähigkeit von Kolonzellen, sollten im Folgenden Caco-2 wt Zellen und ihre stabilen hPPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Klone miteinander verglichen werden. Weiterhin war der Einfluss von konjugierten Linolsäureisomeren, als Beispiel für mehrfach ungesättigte Fettsäuren, auf das Zelladhäsionsmolekül β -Catenin in diesen Zelllinien von Interesse.

6.4.5.1 Genexpressionsprofile von β -catenin in Caco-2 wt Zellen und PPAR δ -Klonen

Zuerst sollte das Zelladhäsionsmolekül β -Catenin auf mRNA-Ebene charakterisiert werden. Hierfür konnten die bereits von der Proliferationsanalyse bekannten Proben (unbehandelte und mit 5 μ M 10E,12Z-CLA behandelte Zellen) verwendet werden (Abschnitt 6.4.3.2). Zunächst wurden alle unbehandelten Zellen mittels semiquantitativer RT-PCR auf die β -catenin mRNA-Expression hin charakterisiert. Auch im Bereich der Zelladhäsion war deutlich zu erkennen, dass die Transkriptmengen des β -catenins zeitabhängig anstiegen und das Gen in dem Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 stärker exprimiert wurde als in der vergleichbaren reprimierenden Caco-2 Zelllinie (DN Klon 7). Die Induktion des β -catenins in Caco-2 wt Zellen lag vom Faktor her zwischen den beiden Klonen.

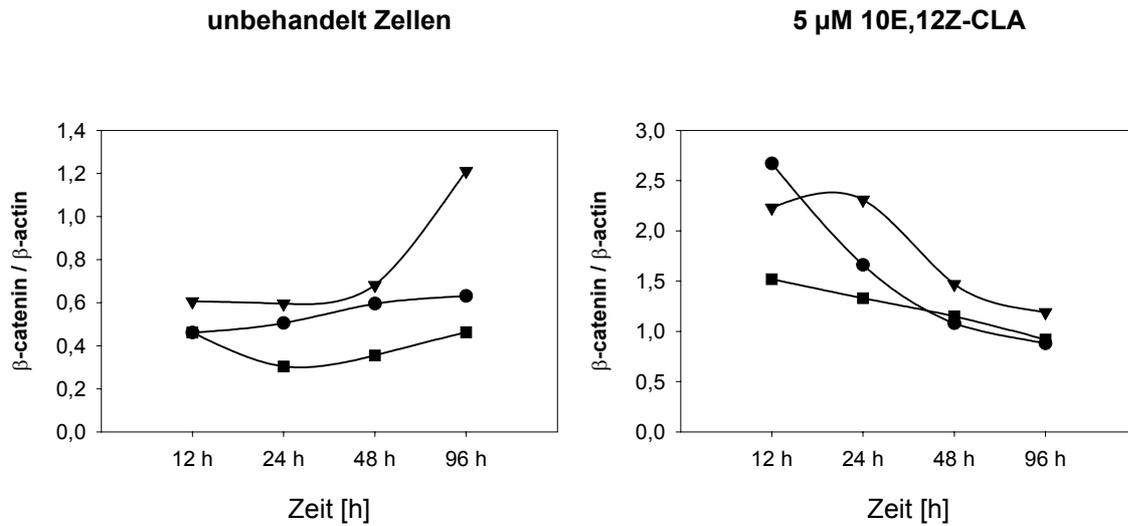


Abbildung 6-46: Zeitabhängiger Vergleich der β -catenin mRNA-Expression von unbehandelten und mit 5 μ M 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen und PPAR δ Klonen (\blacktriangledown +/+ Klon 3, \blacksquare DN Klon 7, \bullet wt). Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden die β -catenin mRNA-Expressionen in den mit 5 μ M 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ -Klonen verglichen (Abb. 6-46). In allen drei Zelllinien konnte die CLA die Transkriptmengen des Gens zeitabhängig hemmen. Weiterhin lag die Expressionskurve von β -catenin in den Caco-2 hPPAR δ +/+ Zellen über der der hPPAR δ DN und wt Zellen. Es deutete einiges darauf hin, dass der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor auch im Bereich der Zelladhäsion Einfluss auf Kolonkarzinomzellen nehmen könnte.

6.4.6 PPAR δ und seine Bedeutung in der Apoptose

Bekannt ist, dass ausgehend von einer Hyperproliferation und einer möglichen Dedifferenzierung, die Apoptoseinhibierung während der Kolonkazinogenese zu invasiven und metastasierenden Karzinomen und damit zur Ausbildung des kolorektalen Kazinoms führen kann. Bis jetzt deutete einiges darauf hin, dass die konjugierten Linolsäureisomere eine Proliferationshemmung hervorrufen könnten. Weiterhin wurde eine leichte Differenzierungssteigerung durch CLA-Einfluss ermittelt. Eine weitere Erklärung für die Wachstumshemmung der Kolonkarzinomzellen könnte, neben der Induktion der Differenzierung, auch die Auslösung der Apoptose sein. Aus diesem Grund sollte im nächsten Kapitel die Apoptose der Kolonkazinomzelllinie Caco-2 analysiert werden. Da der stabile Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 eine stärkere Proliferation zeigte (Abschnitt 6.4.3.1) und ebenfalls die Gene der Proliferation erhöht exprimiert wurden (Abschnitt 6.4.3.2), sollte die Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR δ) während einer möglichen Apoptose parallel untersucht werden.

6.4.6.1 Unterschiede in der Caspase-3 Aktivität von durch 10E,12Z-CLA induzierten Caco-2 Klonen

Das Enzym Caspase-3 gilt als früher Indikator des Apoptosegeschehens und sollte zur Aufklärung der Rolle von PPAR δ in der Apoptose von Kolonkarzinomzellen dienen. Nach Behandlung der Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ Klonen (+/+ Klon 3, DN Klon 7) mit dem potenteren Minorisomer 10E,12Z-CLA, wurde das Cytosol präpariert und anschließend die Caspase-3 Aktivität photometrisch bestimmt (Abschnitt 5.7.3). Bei einer Überexpression von PPAR δ wurden höhere Fettsäurekonzentrationen benötigt, um die Apoptose zu induzieren. Zellen mit reprimiertem PPAR δ gingen früher in den programmierten Zelltod über. Dies könnte bedeuten, dass durch eine Hyperproliferation, ausgelöst durch die PPAR δ -Überexpression in Caco-2 Zellen, die Apoptose inhibiert werden könnte. Die CLAs inhibieren die Proliferation konzentrationsabhängig. Die benötigte hohe CLA-Konzentration für die Proliferationshemmung der Rezeptor überexprimierenden Caco-2 Zellen korreliert mit den in Abbildung 6-47 dargestellten Apoptoseprofilen der behandelten Zelllinien.

Je mehr PPAR δ in den Zellen exprimiert wurde, umso geringer wurde die Apoptose induziert bzw. umso höhere CLA-Konzentrationen wurden benötigt, um die Caspase-3 Aktivität zu steigern. Demnach könnte die Apoptose in Kolonkarzinomzellen aufgrund der typischen PPAR δ -Überexpression inhibiert werden.

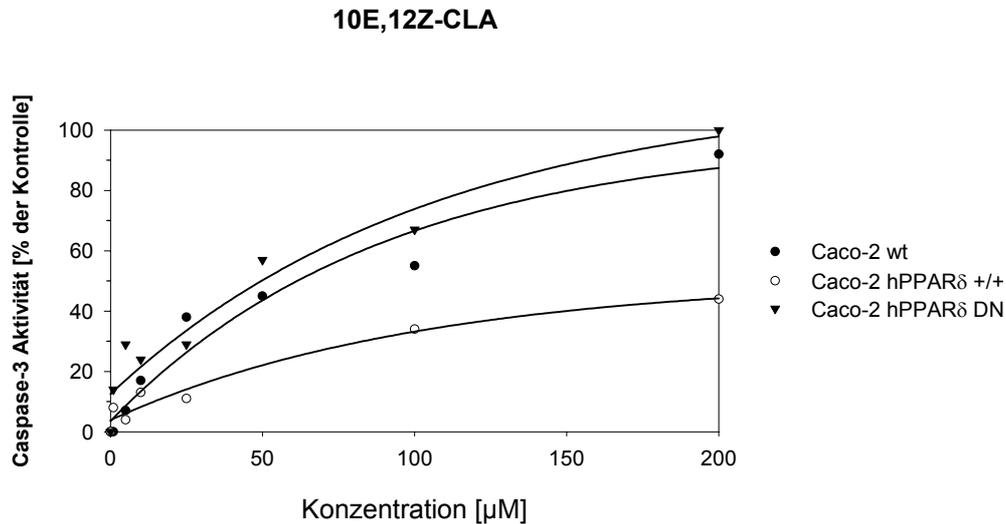


Abbildung 6-47: Caspase-3 Aktivität in Caco-2 wt Zellen und PPAR δ -überexprimierenden sowie –reprimierenden Klonen (+/+ Klon 3, DN Klon 7) nach Induktion mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA. Auf der Ordinatenachse ist die Steigerung der Caspase-3 Aktivität relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben.

6.4.6.2 Wirkung des 10E,12Z-Isomers der Linolsäure auf die Chromatinstruktur von Caco-2 wt Zellen und PPAR δ -Klonen durch Acridine Orange-Färbung

Die Caco-2 wt Zellen und Klone wurden nach Aussaat in 24-Well Platten für 3 Tage mit 100 μ M 10E,12Z-CLA behandelt. Anschließend erfolgte eine Anfärbung des Chromatins mit Acridine Orange (Abschnitt 5.7.2). Apoptotische Zellen wiesen eine starke Orangefärbung ihres kondensierten Chromatins auf und wirkten im Mikroskop rundlich. Teilweise verdichtete sich bereits das Chromatin und lagerte sich am Rand des Zellkerns an. Gesunde Zellen waren blassorange und hatten einen ovalen Zellkern. Sie waren adhären und hafteten stark am Boden der Well Platte an. War die Apoptose bereits eingetreten und weiter fortgeschritten, lagen die betroffenen Zellen im Gegensatz zu gesunden in einer anderen Fokusebene des Mikroskops und waren nicht mehr klar zu erkennen.

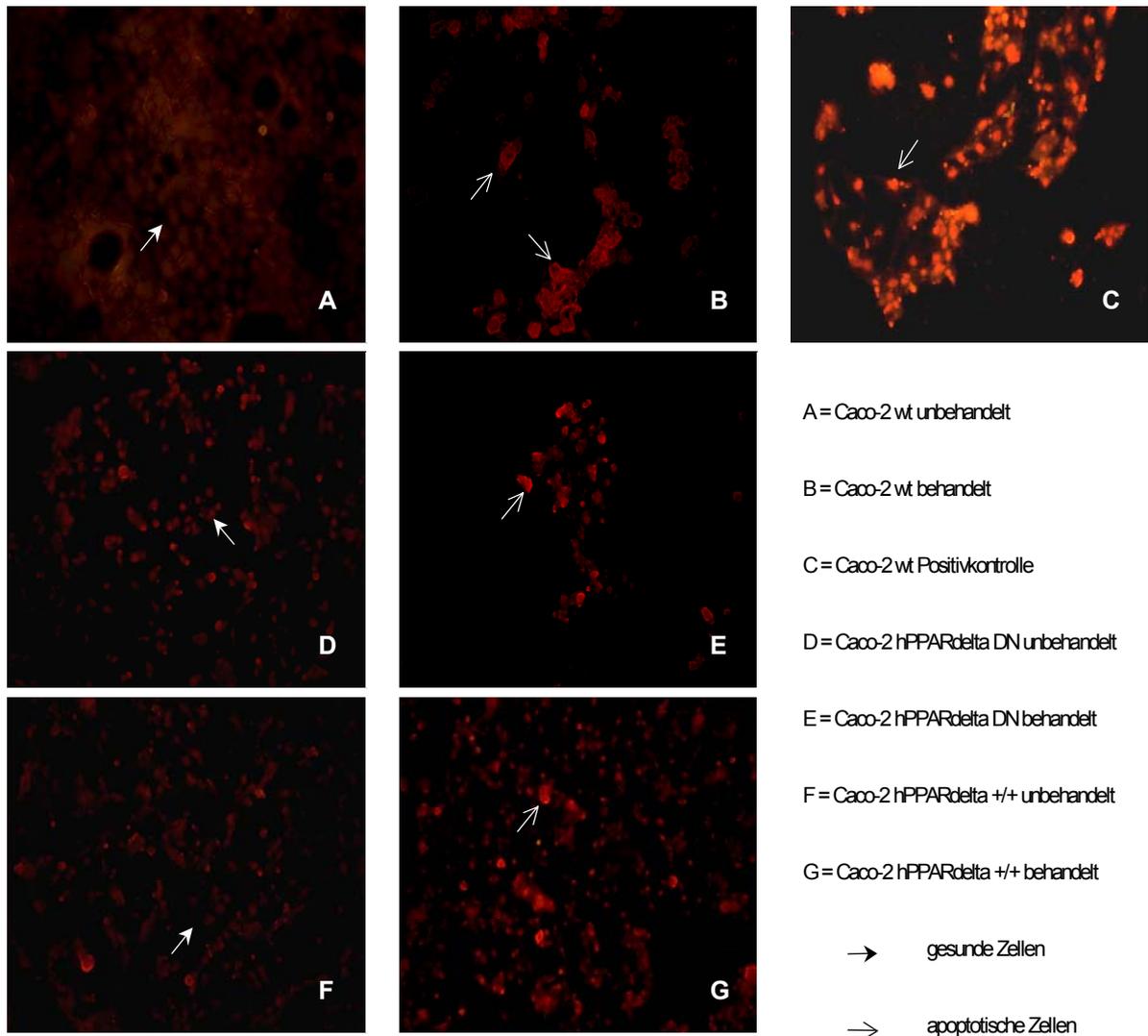


Abbildung 6-48: Acridine Orange-Färbung von Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ -überexprimierenden und -reprimierenden Caco-2 Klonen (+/+ Klon 3, DN Klon 7) nach Induktion mit 100 μ M 10E,12Z-CLA. Dargestellt ist jeweils ein signifikantes Foto der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Als Positivkontrolle wurden 50 μ M Camptothecin eingesetzt.

An Bild C war eindeutig zu erkennen, dass die Positivkontrolle Apoptose auslöste. Die Zellen wirkten durch das stark angefärbte Chromatin grell orange. Beim Vergleich der Bilder A, D und F (jeweils unbehandelte Zellen) wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. B, E und G (behandelte Zellen) hingegen machten deutlich, dass der +/+ Klon 3 von allen Zelllinien am stärksten proliferierte, was wiederum mit den Ergebnissen aus Abschnitt 6.4.3 korrelierte.

100 μM 10E,12Z-CLA lösten in allen drei Zelllinien Apoptose aus, die allerdings nicht die selbe Potenz besaßen wie die Positivkontrolle. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen im Bezug auf die Gesamtzellzahl war in den Caco-2 hPPAR δ +/+ Zellen mit 23 % geringer als in DN oder wt Zellen (Abb. 6-49). Der Unterschied zwischen wt Zellen und dem reprimierenden Klon 7 erwies sich mit 51 % zu 47 % als gering. 50 μM Camptothecin lösten in 98 % aller Caco-2 wt Zellen Apoptose aus.

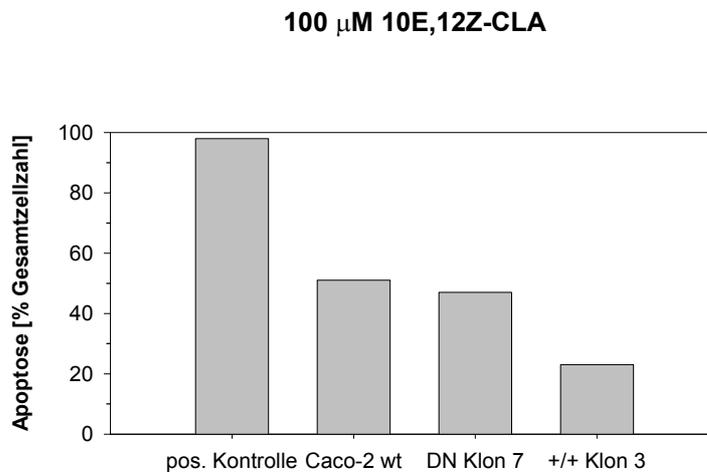


Abbildung 6-49: Auswertung der Acridine Orange-Färbung von Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ -überexprimierenden und –reprimierenden Caco-2 Klonen (+/+ Klon 3, DN Klon 7) nach Induktion mit 100 μM 10E,12Z-CLA und 50 μM Camptothecin (pos. Kontrolle). Auf der Ordinatennachse ist die Apoptoserate in % der Gesamtzellzahl angegeben.

6.5 Vergleichende Studien von PPAR δ in HCT116 Zelllinien

6.5.1 Proliferation von HCT116 Zelllinien zur Identifizierung der Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ unter Einfluss von konjugierten Linolsäureisomeren in der Kolonkarzinogenese

Die Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ in der Kolonkarzinogenese wurde zusätzlich anhand von nicht transformierten HCT116 Zelllinien charakterisiert. Da eine dieser Zelllinien im Bezug auf PPAR δ genetisch verändert wurde (Abschnitt 4.6), sollten die Ergebnisse der Caco-2 PPAR δ -überexprimierenden und -reprimierenden Klone mit diesen Zellen verglichen werden. Die HCT116 Zelllinien wurden parallel zu den Caco-2 Klonen auf ihre Proliferationseigenschaften unter CLA-Behandlung untersucht. Beide Linien wurden nach Aussaat 3 Tage konzentrationsabhängig mit den 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA Isomeren behandelt. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der Stoffwechselaktivität der Zellen photometrisch. Die HCT116 hPPAR δ +/+ Zellen steigerten zuerst ihre Proliferation unter Einfluss des CLA-Hauptisomers. Erst bei Konzentrationen > 100 μ M setzt eine inhibierende Wirkung ein. Die HCT116 hPPAR δ -/- Zellen zeigten nur einen kurzen Anstieg in ihrem Wachstumsverhalten und wurden bereits ab 25 μ M 9Z,11E-CLA in ihrer Proliferation inhibiert. In extrem hohen Konzentrationsbereichen lag kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien vor.

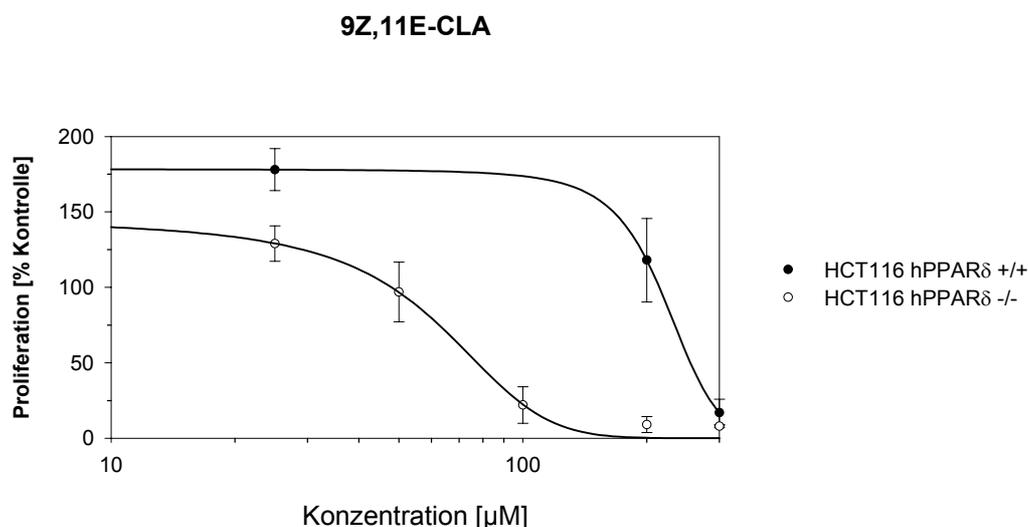


Abbildung 6-50: Proliferation der HCT116 Zelllinien nach Behandlung mit dem Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinate ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.

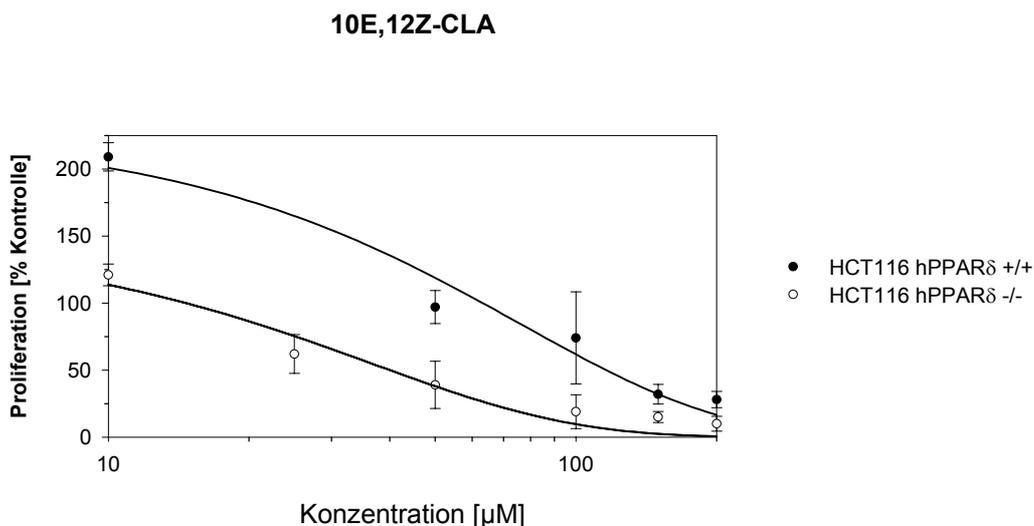


Abbildung 6-51: Proliferation der HCT116 Zelllinien nach Behandlung mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.

Auch bei der Behandlung der HCT116 Zelllinien mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA wurde die Proliferation in geringen Dosierungen angeregt. Bei einer Konzentration von 10 μ M trat in beiden Linien eine Proliferationshemmung ein, die in den hPPAR δ -/- Zellen deutlich stärker war als in der überexprimierenden Zelllinie. Beim Vergleich der beiden CLA-Isomere wurde eine höhere Potenz des Minorisomers festgestellt, was die vorangegangenen Versuche mit den Caco-2 Klonen bestätigte. In Tabelle 6-5 sind die vergleichenden IC₅₀ Werte aufgelistet.

Tabelle 6-5: IC₅₀ Werte der Proliferationshemmung von HCT116 Zelllinien. Alle Werte wurden mit dem Programm Table Curve 2D, Version 5.01 berechnet.

	9Z,11E-CLA	10E,12Z-CLA
HCT116 hPPARdelta +/+	257,9 μ M	125,6 μ M
HCT116 hPPARdelta -/-	81,6 μ M	40,3 μ M

Es war klar erkennbar, dass der IC₅₀ Wert in den hPPARdelta -/- Zellen im Schnitt 60-70 % unter dem Wert der hPPARdelta +/+ Linie lag. Weiterhin hatte die 10E,12Z-CLA eine durchschnittlich doppelt so starke Potenz in ihrer inhibierenden Wirkung im Vergleich zum Hauptisomer.

6.5.2 Differenzierte Genexpression in der Proliferationsphase von induzierten HCT116 Zelllinien

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die konjugierten Linolsäureisomere die Proliferation der beiden nicht transformierten HCT116 Zelllinien unterschiedlich stark hemmen. Es ließ sich vermuten, dass PPAR δ dabei eine wichtige Rolle spielen könnte. Um den Einfluss des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors näher zu charakterisieren, sollten im Folgenden Expressionsprofile der Proliferationsmarker *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* in unbehandelten HCT116 Zelllinien erstellt werden. Hierzu wurden HCT116 hPPAR δ $+/+$ und hPPAR δ $-/-$ Zellen (Abschnitt 4.6) in großen Flaschen ausgesät und zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 6 h und 48 h geerntet. Nach Ernte der jeweiligen Zellen wurde die Gesamt-RNA nach Chomczynski & Sacchi (Abschnitt 5.8.1) präpariert und die Transkriptmengen der jeweiligen Gene unter Verwendung der semiquantitativen RT-PCR-Methode (Abschnitt 5.8.6) bestimmt. Zur Standardisierung der Zielgene wurde, wie schon in Kapitel 6.3.3 erwähnt, das „housekeeping Gen“ *β -actin* herangezogen.

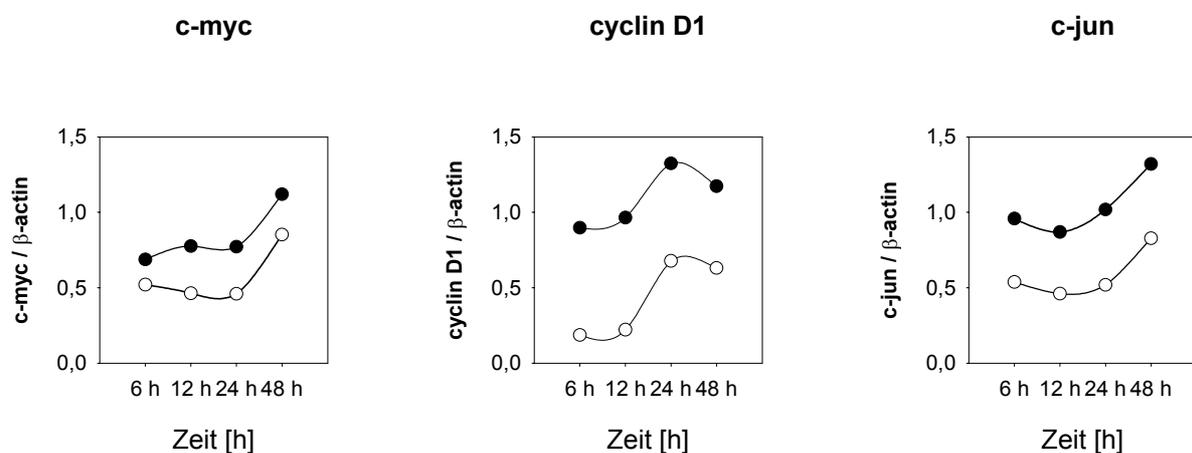


Abbildung 6-52: Zeitabhängige mRNA-Expression der Proliferationsgene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* in unbehandelten HCT116 PPAR δ $+/+$ Zellen (●) im Vergleich zu HCT116 PPAR δ $-/-$ Zellen (○). Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

In Abbildung 6-52 ist eine zeitabhängige Steigerung der Expression aller drei Proliferationsgene in unbehandelten Zellen zu sehen. Erkennbar ist weiterhin, dass die Expressionen der Gene in der hPPAR δ Knockout Zelllinie durchgehend unter dem Level der hPPAR δ stark exprimierenden Zellen lagen.

Ergebnisse

Im Weiteren wurden beide HCT116 Zelllinien konzentrationsabhängig mit dem potenteren Minorisomer der konjugierten Linolsäure 10E,12Z behandelt und ebenfalls in dem o.g. Zeitfenster geerntet. Nach Präparation der Gesamt-RNA (s.o.) und cDNA-Synthese wurden erneut Expressionsprofile der drei Proliferationsgene mittels semiquantitativer RT-PCR erstellt.

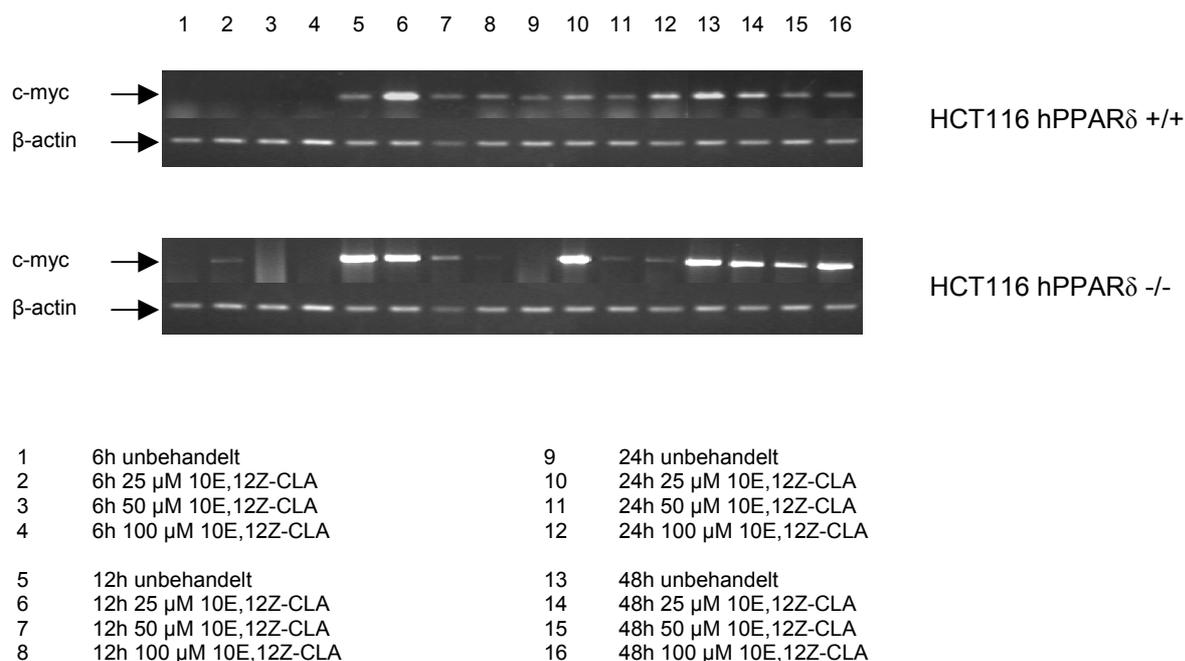


Abbildung 6-53: Zeitabhängige Expression von *c-myc* in mit 10E,12Z-CLA behandelten HCT116 PPAR δ +/+ Zellen im Vergleich zu HCT116 PPAR δ -/- Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 6-53 ist zu erkennen, dass in beiden Zelllinien in den ersten 6 h keine Einflüsse der CLA-Behandlung auf die *c-myc* mRNA-Expression ersichtlich wurden. Nach ≥ 12 h wurde das Proliferationsgen in den hPPAR δ +/+ Zellen durch die CLA leicht induziert, wobei insgesamt eine konzentrationsabhängige Hemmung eintrat. Die Ergebnisse der Transkriptmengen in den Gelen korrelierten mit der Beobachtung, dass die Proliferation in Kolonkarzinomzellen in geringen Konzentrationsbereichen zunächst induziert wurde (Abschnitt 6.5.1).

Ergebnisse

Beim Vergleich der densitometrisch ausgewerteten Transkriptmengen der Proben mit den jeweiligen unbehandelten Zellen wurde deutlich, dass die mRNA-Expression von *c-myc* in HCT116 hPPAR δ $+/+$ Zellen höher lag, als in der genetisch veränderten Zelllinie. Es deutete einiges darauf hin, dass PPAR δ einen Einfluss auf die Expression von Proliferationsgenen haben musste. Weiterhin konnte vermutet werden, dass auch konjugierte Linolsäuren einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die veränderte Proliferationseigenschaft der beiden Zelllinien hatten.

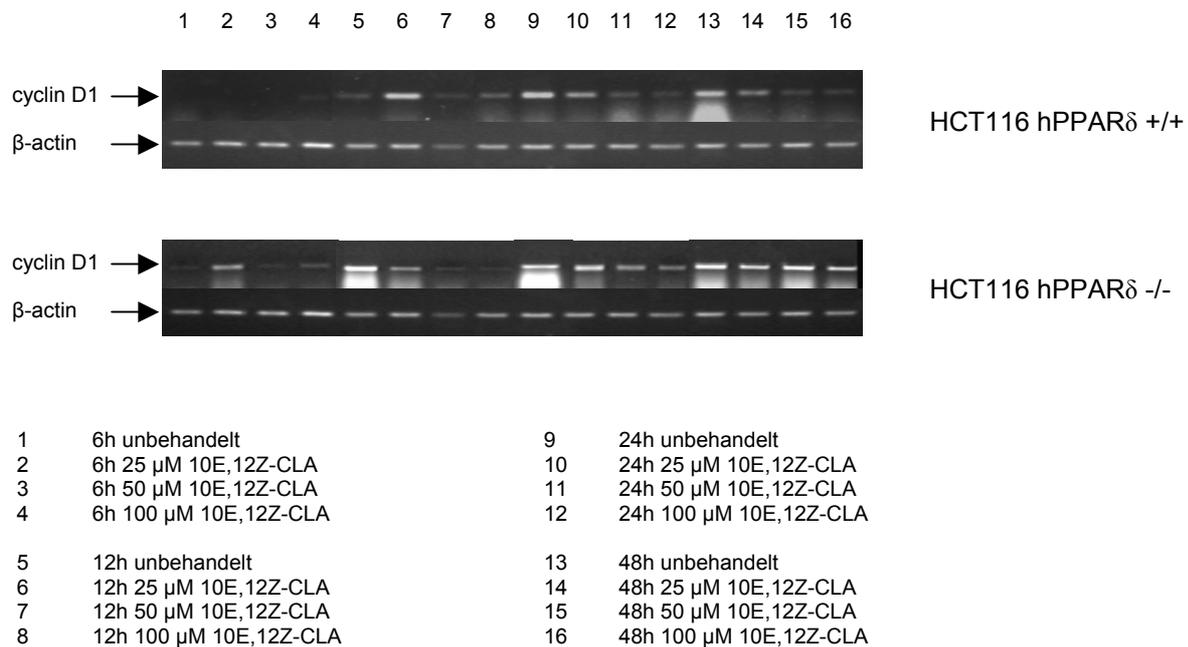


Abbildung 6-54: Zeitabhängige Expression von *cyclin D1* in mit 10E,12Z-CLA behandelten HCT116 PPAR δ $+/+$ Zellen im Vergleich zu HCT116 PPAR δ $-/-$ Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von drei unabhängigen Experimenten.

Die beiden weiteren Proliferationsmarker *cyclin D1* (Abb. 6-54) und *c-jun* (Abb. 6-55) erbrachten vergleichbare Ergebnisse, wie das Gen *c-myc*. Das Minorisomer 10E,12Z-CLA zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der *cyclin D1* mRNA-Expression in beiden Zelllinien, wobei die Transkriptmengen des Gens im Bezug auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen, übereinstimmend mit vorherigen Ergebnissen, in den HCT116 hPPAR δ $+/+$ Zellen höher lagen.

Ergebnisse

Auch die Expressionsprofile von *c-jun* ergaben ein ähnliches Bild. Die Expression des Gens wurde zeit- und konzentrationsabhängig von der konjugierten Linolsäure inhibiert. Unterschiede in den beiden Zelllinien deuteten auch hier darauf hin, dass dem Rezeptor PPAR δ eine Rolle während der Proliferationsphase von Kolonkarzinomzellen zukommen müsste.

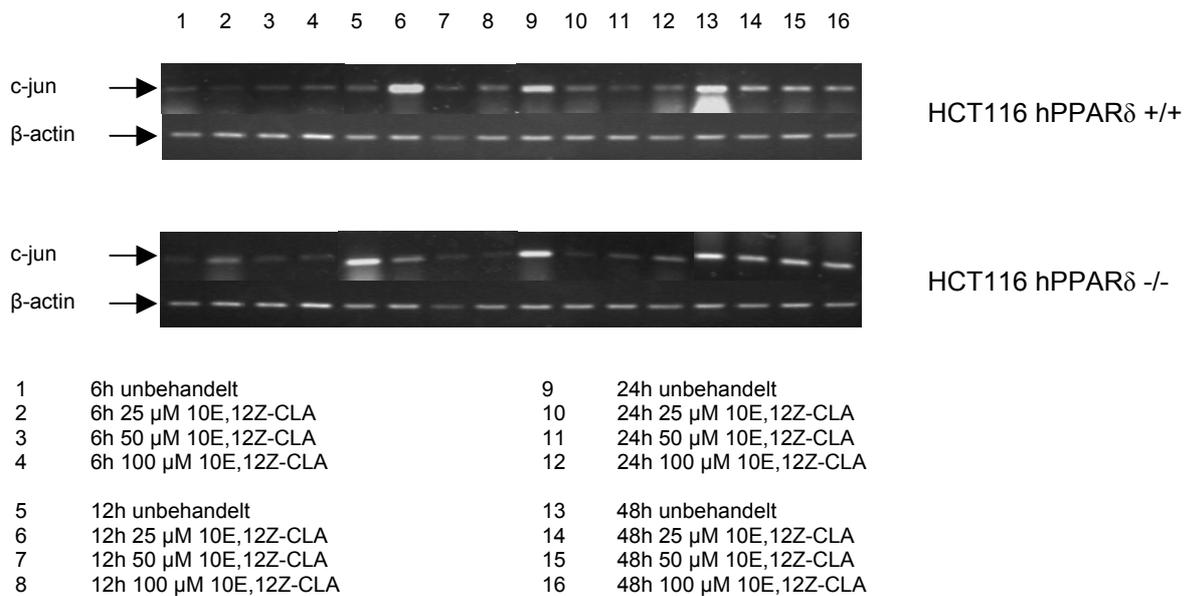


Abbildung 6-55: Zeitabhängige Expression von *c-jun* in mit 10E,12Z-CLA behandelten HCT116 PPAR δ +/+ Zellen im Vergleich zu HCT116 PPAR δ -/- Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Tendenzen aus den Versuchen zur Inhibierung der Proliferation von nicht transformierten HCT116 Zelllinien durch konjugierte Linolsäureisomere mit der Hemmung der Expression der Proliferationsmarker einhergehen. Es konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt, ausgelöst von den CLAs, auf das Wachstum der Zellen gezeigt werden. Weiterhin beeinflusste das Vorhandensein von PPAR δ den Proliferationsverlauf maßgeblich.

6.6 Verzweigt-kettige Fettsäuren

Im nächsten Abschnitt sollte geklärt werden, inwieweit verzweigt-kettige Fettsäuren Einfluss auf die verschiedenen Spezies und molekularen Mechanismen der Zellen haben. Als Testsubstanz wurde hierfür die Phytansäure gewählt. Phytansäure wurde bereits als RXR-Ligand beschrieben [Le Motte et al., 1996] und lässt sich strukturell vom Antiepileptikum Valproinsäure (2-Propyl-Pentansäure) ableiten.

6.6.1 Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ durch verzweigt-kettige Fettsäuren

Für die PPAR δ -Aktivierung in HEK293 Zellen wurden diese, nach Transfektion mit dem Rezeptor, konzentrationsabhängig mit Phytansäure behandelt. Dies geschah nach Protokoll der CLAs (Kapitel 6.3.1). Nach einer Induktion von 48 h wurde die Luciferaseaktivität im Zelllysat bestimmt und die Induktion des Rezeptors relativ zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Als Positivkontrolle wurden 100 μ M Bromopalmitat eingesetzt. Deutlich wurde, dass auch verzweigt-kettige Fettsäuren den Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor δ aktivieren konnten (Abb. 6-56). In den Konzentrationsbereichen der konjugierten Linolsäureisomere aktivierten 200 μ M Phytansäure PPAR δ um den Faktor 7,8. Zum Vergleich, bei 200 μ M 9Z,11E-CLA lag die Induktion im gleichen Bereich und bei 200 μ M 10E,12Z-CLA bei 18,6.

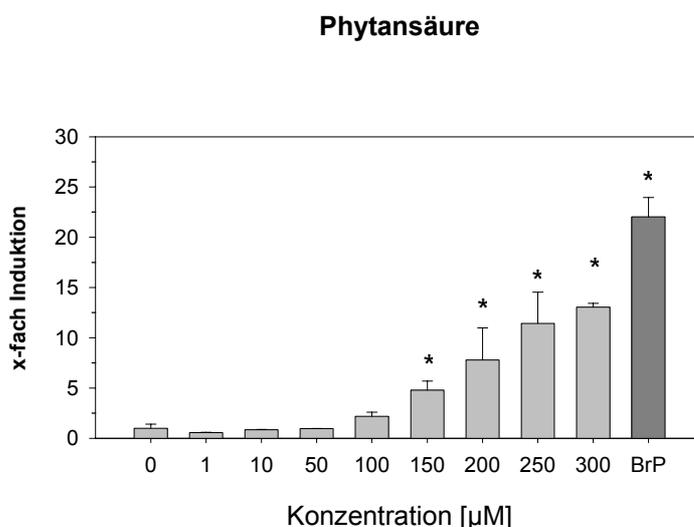


Abbildung 6-56: PPAR δ -Aktivierung durch Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenaachse ist die Induktion des Rezeptors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

6.6.2 Genexpressionsstudien von *PPAR δ* in mit Phytansäure behandelten HT29 Zellen

Zur Analyse der Genexpression des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors *PPAR δ* wurden die gleichen Parameter gewählt, wie in Kapitel 6.3.3 für die CLA-Untersuchungen beschrieben. HT29 Zellen wurden konzentrationsabhängig mit Phytansäure behandelt und nach 48 h bzw. 96 h geerntet. Unbehandelte HT29 Zellen zeigten in ihrer Proliferationsphase eine zeitabhängige Induktion von *PPAR δ* (Abb. 6-7). Nach RT-PCR und densitometrischer Auswertung der *PPAR δ* Transkriptmengen wurde deutlich, dass die Phytansäure ebenfalls die Genexpression des Rezeptors konzentrations- und zeitabhängig inhibieren konnte. Verglichen mit der Potenz des CLA-Minorisomers 10E,12Z-CLA ließ sich vermuten, dass die Hemmung der mRNA-Expression von *PPAR δ* durch Phytansäure ähnlich stark sein könnte.

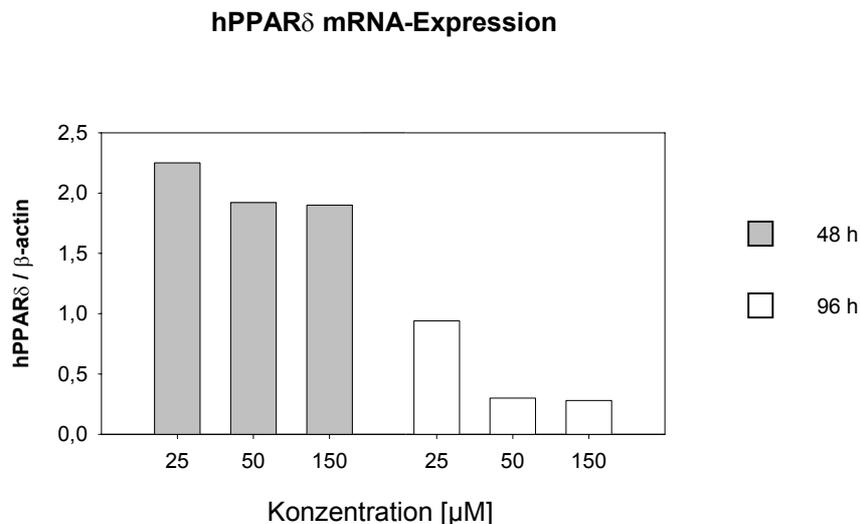
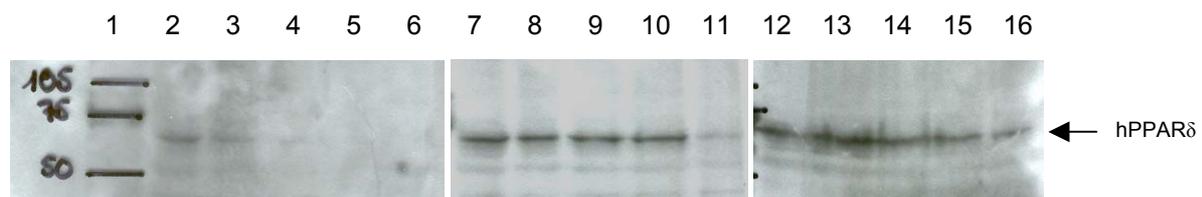


Abbildung 6-57: Zeit- und konzentrationsabhängige *PPAR δ* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels von drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

6.6.3 Effekte der Phytansäure auf das PPAR δ Protein in HT29 Zellen

Da gezeigt werden konnte, dass Phytansäure in der Lage sein könnte, *PPAR δ* auf molekularer Ebene konzentrationsabhängig zu hemmen, sollte im nächsten Abschnitt das *PPAR δ* Protein untersucht werden. Hierzu wurden HT29 in großen Zellkulturflaschen ausgesät und mit Konzentrationen von 0 – 150 μ M Phytansäure behandelt. Nach 1, 2 und 4 Tagen wurden die entsprechenden Proben geerntet, die jeweiligen Kernextrakte präpariert und die Proteine (5 μ g / Probe) anschließend in einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt (Abschnitt 5.9). Nach Blotten der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran und Blocken der Membran mit 5 % Milchpulver wurde das *PPAR δ* Protein mit dem Antikörper PPAR β (H-74): sc-7197 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) bei 4° C über Nacht detektiert. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag mit dem ECL Detection System (Amersham, Braunschweig, Deutschland).



1	Marker				
2	24h unbehandelt	7	48 h unbehandelt	12	96 h unbehandelt
3	24 h 25 μ M Phytansäure	8	48 h 25 μ M Phytansäure	13	96 h 25 μ M Phytansäure
4	24 h 50 μ M Phytansäure	9	48 h 50 μ M Phytansäure	14	96 h 50 μ M Phytansäure
5	24 h 100 μ M Phytansäure	10	48 h 100 μ M Phytansäure	15	96 h 100 μ M Phytansäure
6	24 h 150 μ M Phytansäure	11	48 h 150 μ M Phytansäure	16	96 h 150 μ M Phytansäure

Abbildung 6-58: Zeit- und konzentrationsabhängige hPPAR δ Proteinexpression in HT29 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Gezeigt sind repräsentative Western Blots von drei unabhängigen Experimenten. Aufgrund der Probenanzahl wurden immer drei Blots parallel durchgeführt (Nr. 1–6, Nr. 7-11 und Nr. 12–16).

Anhand der Blots war zu erkennen, dass auch das *PPAR δ* Protein durch die Phytansäure beeinflusst wurde. Die Proteinexpression in unbehandelten HT29 Zellen stieg im Laufe der 96 h kontinuierlich an, während *PPAR δ* von der Phytansäure konzentrationsabhängig innerhalb der 4 Tage gehemmt wurde. Die Ergebnisse korrelierten sehr gut mit dem vorher erstellten Genexpressionsprofil des Rezeptors. Zu bemerken war, dass die Hemmung der Genexpression vor der Inhibierung der Proteinexpression durch die Fettsäure einsetzte.

6.6.4 Proliferationsstudien von Phytansäure beeinflusster Kolonkarzinomzellen

6.6.4.1 Durch verzweigt-kettige Fettsäuren beeinflusster Proliferationsverlauf verschiedener Zelllinien

Dass die Proliferation in verschiedenen Spezies unterschiedlich stark ist, haben die Untersuchungen der konjugierten Linolsäureisomere gezeigt. Alle drei verwendeten Zelllinien wurden nun auf ihren Proliferationsverlauf unter steigender Phytansäurekonzentration analysiert. Nach Aussaat der Zellen wurden diese für 3 Tage konzentrationsabhängig mit Phytansäure induziert, um im Abschluss daran die Stoffwechselaktivität der Zellen messen zu können (Kapitel 5.5.3). Die Proliferation wurde durch Phytansäureeinflüsse in allen Zelllinien gehemmt. Die IC_{50} Werte lagen für Caco-2 Zellen bei $50,2 \mu\text{M}$, bei HT29 Zellen bei $40,3 \mu\text{M}$ und bei der Mauszelllinie F9 bei $21,1 \mu\text{M}$. Der Effekt, den die Phytansäure bewirken konnte, lag demnach im Durchschnitt zwischen den Halbwertskonzentrationen des CLA-Hauptisomers 9Z,11E und dem biologisch potenteren Minorisomer 10E,12Z-CLA.

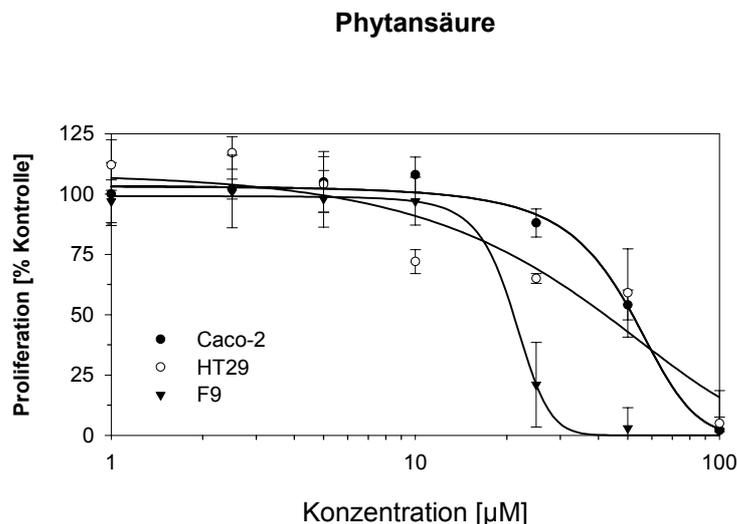


Abbildung 6-59: Proliferation der Zelllinien unter Einfluss der Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=5$). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100 % Wachstum bezeichnet. Alle Werte ab 72 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar ($P < 0,05$).

6.6.4.2 Effekte der Phytansäure auf die Genexpression bekannter Proliferationsgene in HT29 Zellen

Um zu untersuchen, inwieweit die Expression von Proliferationsgenen durch Phytansäure möglicherweise beeinflusst werden könnte, wurden HT29 Zellen ausgesät und anschließend konzentrationsabhängig mit der verzweigt-kettigen Fettsäure behandelt. Nach 2 und 4 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA nach Chomczynski & Sacchi (Abschnitt 5.8.1) präpariert. Die Transkriptmengen der jeweiligen Markergene der Proliferation wurden unter Verwendung der semiquantitativen RT-PCR-Methode (Abschnitt 5.8.6) bestimmt. Zur Standardisierung der Zielgene wurde, wie schon in Kapitel 6.3.3 erwähnt, das „housekeeping Gen“ β -actin herangezogen. In Abbildung 6-60 ist, zum Vergleich, die normale Expression der jeweiligen Gene in unbehandelten HT29 Kontrollzellen zu sehen. Alle drei untersuchten Gene zeigten einen Anstieg innerhalb der ersten 96 h.

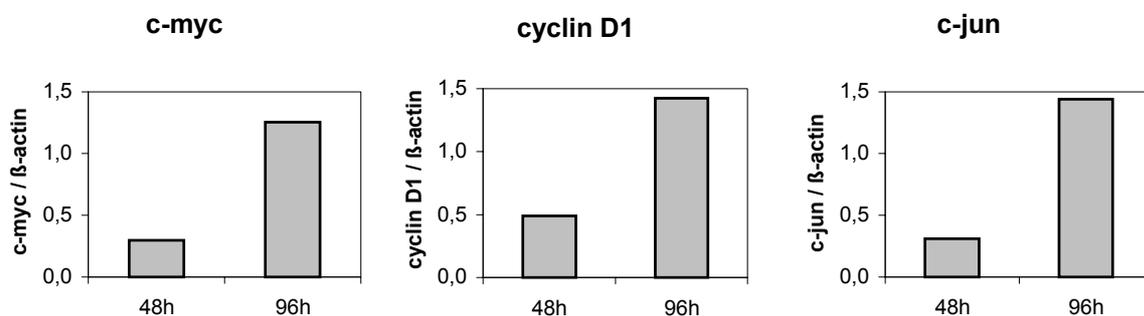


Abbildung 6-60: Zeitabhängige Expression von Proliferationsgenen in unbehandelten HT29 Zellen. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Im Weiteren wurden die behandelten Proben im Bezug auf die Proliferationsgene analysiert und ausgewertet. In Abbildung 6-61 war klar zu erkennen, dass *c-myc* zeitabhängig durch Phytansäureeinfluss herunterreguliert wurde. Eine Konzentrationsabhängigkeit innerhalb eines Zeitpunktes war ebenfalls zu beobachten.

Ergebnisse

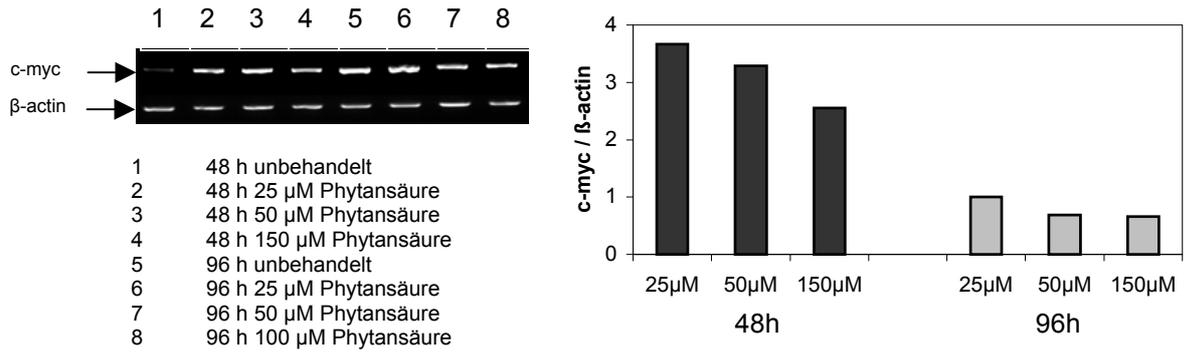


Abbildung 6-61: *c-myc* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf der Ordinatenachse ist die Ratio des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

Das selbe Ergebnis trat auch beim Expressionsprofil von *cyclin D1* auf (Abb. 6-62). Die Transkripte waren konzentrationsabhängig von der Phytansäure herunterreguliert worden.

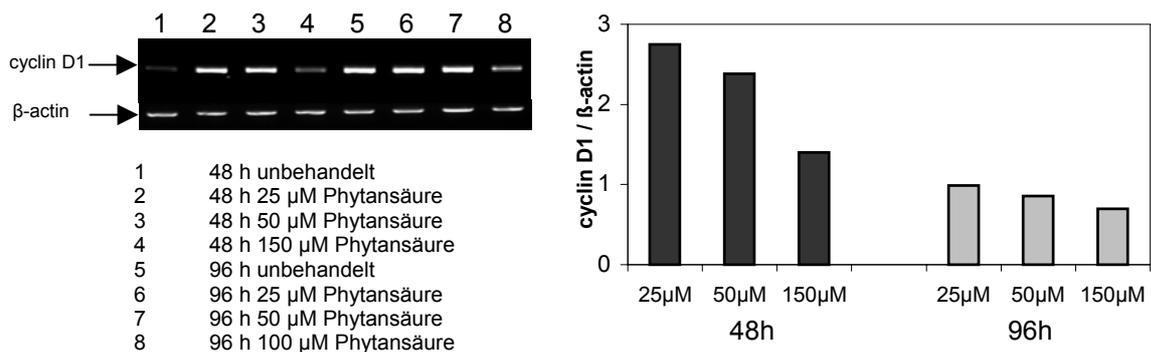


Abbildung 6-62: *Cyclin D1* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf der Ordinatenachse ist die Ratio des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

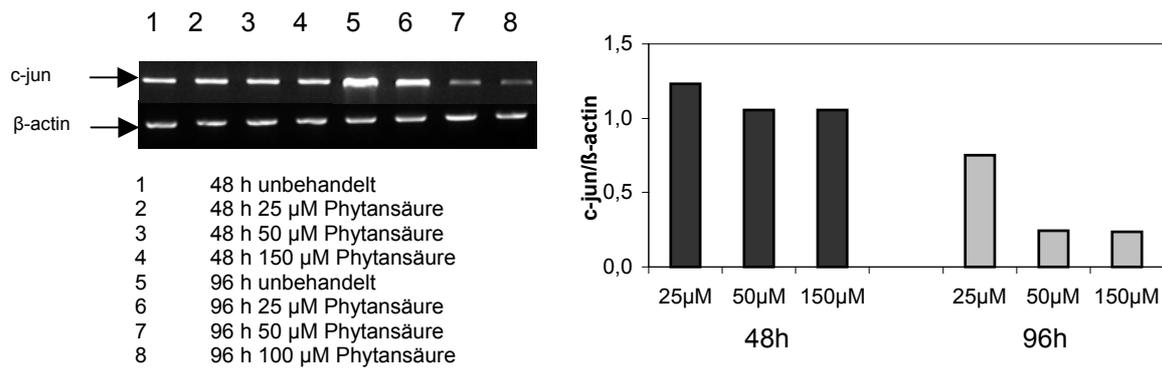


Abbildung 6-63: *c-jun* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf der Ordinatennachse ist die Ratio des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

Auch in Abbildung 6-63 war zu erkennen, dass das Markergen *c-jun* mit steigender Konzentration und Zeit von der Phytansäure beeinflusst werden konnte. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Phytansäure, genauso wie die CLAs, eine Hemmung der Gene der Proliferation in Kolonkarzinomzellen auslöste. Als Beispiel für eine verzweigt-kettige Fettsäure korrelierte ihr Effekt auf die Proliferationsmarker auf mRNA-Ebene mit der Inhibition der Proliferation bei steigender Konzentration auf Caco-2, HT29 und F9 Zellen.

6.6.4.3 Durch Phytansäure veränderte Aktivität von *myc* und *AP-1*

Verzweigt-kettige Fettsäuren beeinflussen die Proliferation von Karzinomzellen in ähnlichen Konzentrationen wie die konjugierten Linolsäureisomere. Um diese Vermutung zu unterstreichen, wurde die Promotoraktivität des Proliferationsgens *c-myc* ermittelt. Mit pMyc-SEAP transfizierte HEK293 Zellen wurden mit verschiedenen Phytansäurekonzentrationen behandelt. Nach 24 h wurde die Promotoraktivität gemessen (Abschnitt 5.5.2). Da das Aktivator-Protein 1 als ein weiteres Steuerelement von Proliferationsgenen fungiert, wurde zusätzlich der Effekt der Phytansäure auf die AP-1 Aktivität untersucht. HEK293 Zellen wurden ebenfalls für 24 h mit der Phytansäure konzentrationsabhängig behandelt, um anschließend die Aktivität des Transkriptionsfaktors bestimmen zu können (Abschnitt 5.5.1).

Ergebnisse

Für beide Versuche wurde, wie schon bei den CLA-Untersuchungen, 1 mM Valproinsäure (VPA) als Positivkontrolle eingesetzt. In Abbildung 6-64 ist zu erkennen, dass die Promotoraktivität des *c-myc* Gens durch Phytansäure konzentrationsabhängig sank. Die Potenz dieser verzweigt-kettigen Fettsäure, die Induktion zu hemmen, ist geringer als die vergleichenden konjugierten Linolsäureisomere. Weiterhin beeinflusste die Phytansäure auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP1 in Abhängigkeit der Konzentration. In beiden Versuchen zeigte die Valproinsäure als Positivkontrolle ähnliche Werte, wie bei den CLA-Untersuchungen.

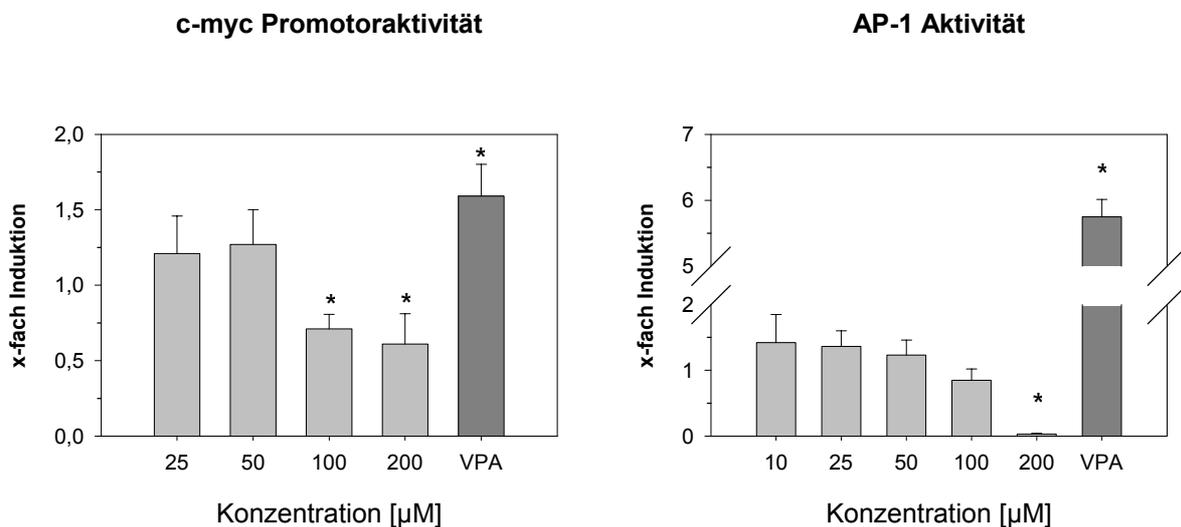


Abbildung 6-64: Messung der *myc*- und *AP-1* Aktivität in HEK293 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=9). Auf der Ordinatenachse ist die Promotoraktivität relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P < 0,05$) angegeben.

Abschließend lässt sich sagen, dass alle Analysen im Bezug auf die Proliferation übereinstimmen. Die Proliferationshemmung der Kolonkarzinomzelllinien korrelierte mit der konzentrationsabhängigen Inhibition der Proliferationsgene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* und weiterhin mit der Abnahme der Aktivitäten des *c-myc* Promotors und des AP1 Transkriptionsfaktors. Die Phytansäure zeigte demnach, verglichen mit den CLA-Isomeren, ähnliche Effekte in der Proliferationsphase der Zellen.

6.6.5 Verzweigt-kettige Fettsäuren und Differenzierung

6.6.5.1 Spezifische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase zur Bestimmung der Differenzierung von Caco-2 Zellen durch verzweigt-kettige Fettsäuren

Phytansäure schien in der Lage zu sein, die Proliferation von Kolonkarzinomzellen zu inhibieren. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob und wie verzweigt-kettige Fettsäuren die Differenzierung forcieren könnten. Zur Analyse wurde die enzymatische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase in der Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen bestimmt. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit steigender Phytansäurekonzentration behandelt. Nach einer Inkubation von 7 Tagen konnte die IAP-Enzymaktivität im Zellhomogenat ermittelt werden. Die Aufarbeitung der Zellen, Messung des Enzyms und Berechnung der spezifischen Enzymaktivität richtete sich hierbei nach den Angaben aus den CLA-Versuchen (Kapitel 6.3.5.1). Erstaunlicherweise schien die Phytansäure konzentrationsabhängig die Differenzierung leicht zu inhibieren. 50 μM Phytansäure inhibierten die IAP-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 22% (Abb. 6-65). Aufgrund dieser Hemmung ließ sich vermuten, dass die Phytansäure möglicherweise einem anderen Mechanismus folgte als die konjugierten Linolsäureisomere vorher gezeigt hatten.

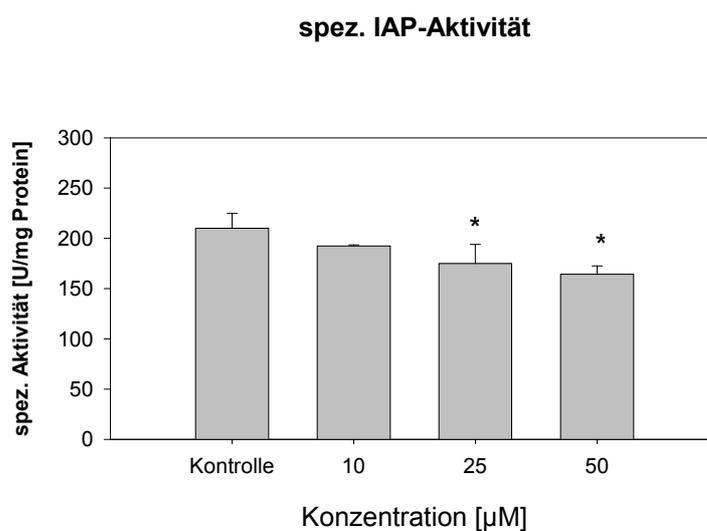


Abbildung 6-65: Spez. Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase in Caco-2 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=4$). Auf der Ordinate ist die Bildung von p-Nitrophenol pro mg Protein angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P<0,05$) angegeben.

6.6.5.2 Promotorstudien zur *IAP*-Aktivität in mit Phytansäure behandelten Caco-2 Zellen

Zur weiteren Charakterisierung dieses Phänomens und zum besseren Vergleich mit den CLA-Ergebnissen wurde der Promotor der Intestinalen Alkalischen Phosphatase ($pIAP_{2,4}$ -Luc) in Caco-2 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit steigender Konzentration an Phytansäure behandelt. Nach 24 h wurde die Promotoraktivität im Luciferaseassay gemessen (Abschnitt 5.5.1). Der *IAP*-Promotor wurde durch die verzweigtkettige Fettsäure, gegen die Erwartungen, induziert (Abb. 6-66). Beim Vergleich mit dem biologischen Hauptisomer der konjugierten Linolsäure (9Z,11E-CLA) lagen die Effekte allerdings im höheren Konzentrationsbereich der Phytansäure. 100 μ M 9Z,11E-CLA aktivierten den Promotor um den Faktor 4,4. Für eine vergleichbare Aktivierung durch die Phytansäure musste eine deutlich höhere Konzentration von 250 μ M (Faktor 4,8) eingesetzt werden.

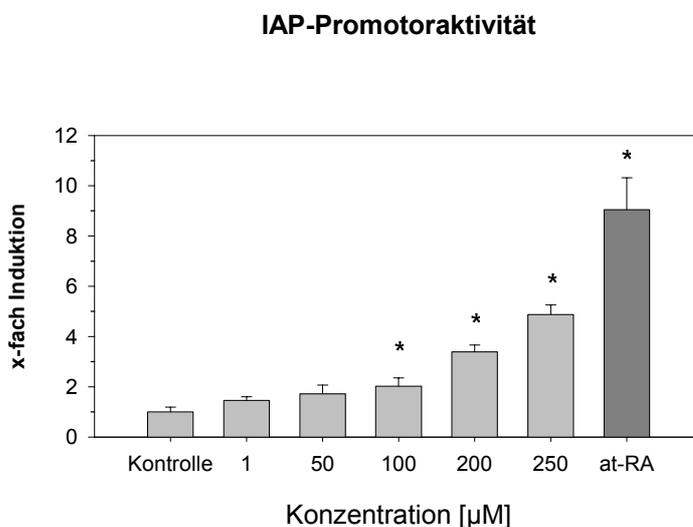


Abbildung 6-66: Promotoraktivität der *IAP* in Caco-2 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=3$). Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P<0,05$) angegeben.

Die ersten beiden Analysen zur Differenzierung von Kolonzellen durch Phytansäure zeigten, dass diese Fettsäure möglicherweise nur leichte differenzierungsfördernde Eigenschaften besaß, die beim Vergleich mit den CLAs in deutlich höheren Konzentrationen lagen.

6.6.5.3 Reporteragenassays zur Aufklärung des Einflusses von Phytansäure auf die Differenzierungsmarker SI, CEA und iFABP in Caco-2 Zellen

Für weitere Analysen zum Differenzierungsbestreben von mit Phytansäure behandelten Zellen wurden drei weitere Marker der Differenzierung, CEA, SI und iFABP, untersucht. Die Promotoren der jeweiligen Marker wurden in Caco-2 Zellen transfiziert und nach 24stündiger Behandlung mit Phytansäure im Reporteragenassay gemessen. Als Positivkontrolle wurde wieder 1 mM Valproinsäure eingesetzt. Konzentrationen der Plasmide, Versuchsbedingungen und Auswertungen der Messdaten erfolgten wie im Kapitel 6.3.5.3 bei den konjugierten Linolsäureisomeren beschrieben. In diesen Versuchen war zu sehen, dass die Aktivität des Differenzierungsmarkers *CEA* durch Phytansäurekonzentrationen bis 25 μM stimuliert wurde, während sich die Promotoraktivität der *SI* nicht signifikant gegenüber der Kontrolle änderte (Abb. 6-67). Die Positivkontrolle VPA wurde weiterhin, wie in den CLA-Experimenten, in vergleichbaren Verhältnissen aktiviert, so dass die auftretenden Effekte auf die *CEA*-Aktivität tatsächlich von der Phytansäure initiiert werden mussten. Die Messergebnisse der *SI*-Aktivierung deuteten aufgrund der induzierten Positivkontrolle darauf hin, dass die verzweigt-kettige Fettsäure hier keinen Einfluss auf den Promotor nahm.

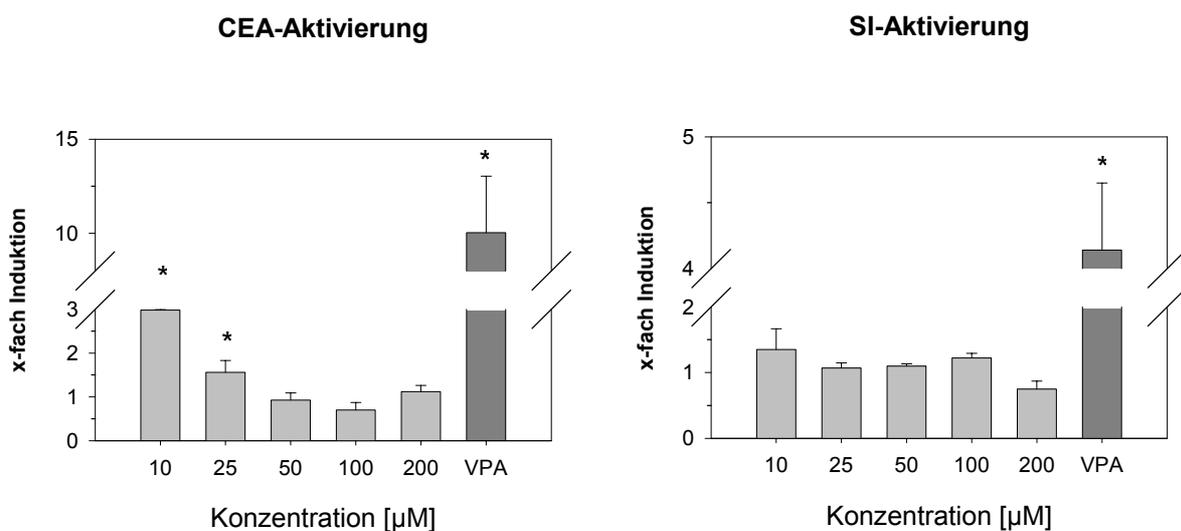


Abbildung 6-67: CEA-Aktivität (Carcinoembryonic antigen) und Aktivität der *SI* (Saccharase-Isomaltase) in Caco-2 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=3$). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion der CEA- bzw. SI-Aktivität relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P<0,05$) angegeben.

Ergebnisse

Der dritte untersuchte Marker *iFABP* verhält sich möglicherweise anders. 50 μM Phytansäure könnten das Protein im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aktivieren (Abb. 6-68), wobei diese Induktion nicht signifikant war. Die CLA-Isomere zeigten bei dieser Konzentration Aktivitäten von 1,3 bzw. 1,9. Die Positivkontrolle VPA lag mit Faktoren von 3,4 (bei CLAs) und 3,6 (bei Phytansäure) im selben Bereich.

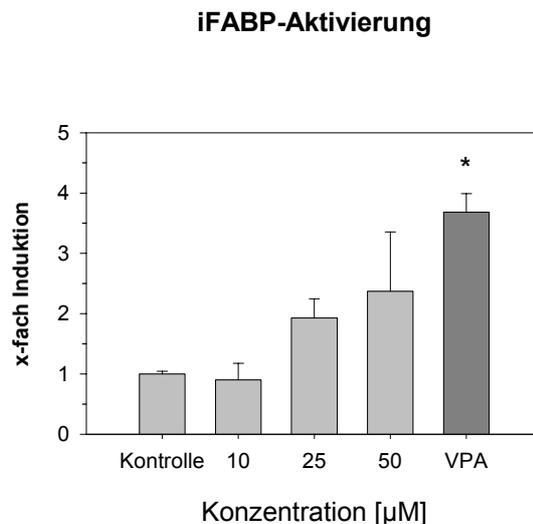


Abbildung 6-68: Aktivität des *iFABP* in Caco-2 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD ($n=3$). Auf der Ordinatenaachse ist die Steigung der *iFABP*-Aktivität relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P<0,05$) angegeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Phytansäure während der Proliferation von Kolonkarzinomzellen eine hemmende Wirkung ausübte. Die durch die Messung der spezifische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase gewonnene Vermutung, dass Phytansäure möglicherweise einem anderen Mechanismus unterlag als die CLAs und nicht stark zur Differenzierung der Zellen beitragen könnte, erhärtete sich anhand dieser Reporterassays. *CEA* wurde in geringen Konzentrationen induziert, anschließend aber wieder auf den Zustand der unbehandelten Kontrolle reduziert. Die *SI* wurde von der Phytansäure gar nicht beeinflusst, während das Fatty acid binding Protein möglicherweise aktiviert werden könnte.

6.6.6 Einfluss der Phytansäure auf die Zelladhäsion von Kolonzellen

6.6.6.1 Phytansäureeffekte auf die Expression von β -catenin in HT29 Zellen

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte davon ausgegangen werden, dass Phytansäure einen proliferationshemmenden Einfluss auf Kolonkarzinomzellen haben könnte, dieser allerdings nicht zwangsweise zu einer forcierten Differenzierung der Zellen führen musste. Zur weiteren Analyse der verzweigt-kettigen Fettsäure wurde der konzentrationsabhängige Effekt auf das bekannte Zelladhäsionsmolekül β -catenin in HT29 Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen ausgesät, mit steigender Phytansäurekonzentration inkubiert und nach 2 und 4 Tagen geerntet. Um die möglicherweise veränderte mRNA-Expression von β -catenin zu vergleichen, wurde die Gesamt-RNA der Proben nach Chomczynski & Sacchi (Abschnitt 5.8.1) präpariert und die Transkriptmengen unter Verwendung der semiquantitativen RT-PCR-Methode (Abschnitt 5.8.6) bestimmt. Zur Standardisierung des Gens wurde, wie schon in Kapitel 6.3.3 erwähnt, das „housekeeping Gen“ β -actin herangezogen. Anhand der unbehandelten Zellkontrollen wurde deutlich, dass die Expression des β -catenin Gens zeitabhängig steigt. Wurden diese Ergebnisse mit den phytansäurebehandelten Zellen verglichen, so nahm die Genexpression des Zelladhäsionsmoleküls, nach einer anfänglichen Induktion, zeitabhängig und mit zunehmender Konzentration ab. Es deutete einiges darauf hin, dass die Phytansäure einen Einfluss auf die Zelladhäsion von Kolonkarzinomzellen haben könnte.

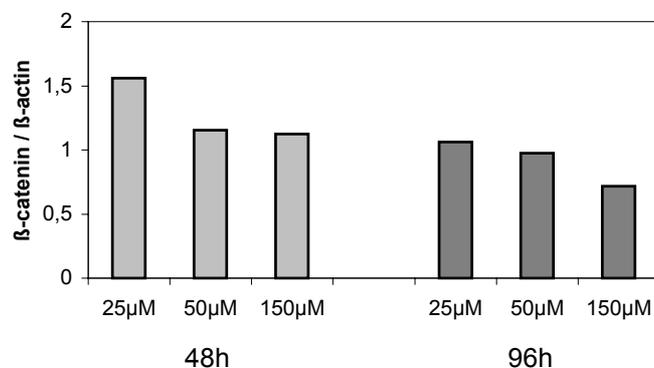


Abbildung 6-69: Zeit- und konzentrationsabhängige β -catenin Expression in HT29 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels von drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

6.6.7 PPAR δ unter dem Einfluss von Phytansäure

6.6.7.1 Proliferationsverlauf der Caco-2 PPAR δ - Klone nach Behandlung mit Phytansäure

Um zu untersuchen, ob und inwieweit verzweigt-kettige Fettsäuren Einfluss auf den Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor δ in der Proliferationsphase von Kolonkarzinomen haben könnten, wurden die bereits von den CLA-Studien bekannten hPPAR δ -überexprimierenden und -reprimierenden Caco-2 Klone (+/+ Klon 3, DN Klon 7; siehe auch Kapitel 6.4.1) mit steigender Konzentration der Phytansäure behandelt. Nach 3 Tagen wurde die Stoffwechselaktivität der jeweiligen Zellen mit dem „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ (Promega, G3582) analysiert (Abschnitt 5.5.3) und photometrisch gemessen.

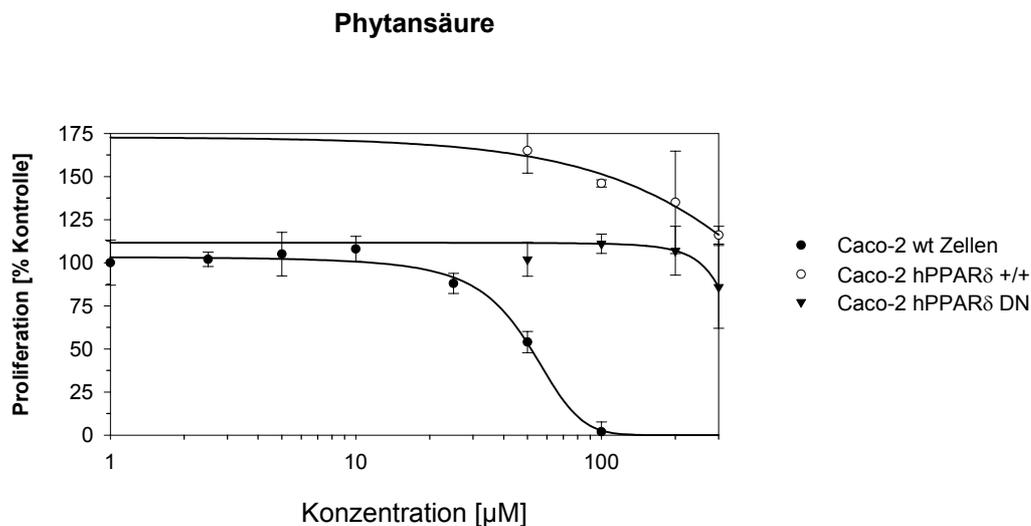


Abbildung 6-71: Proliferationsverlauf der Caco-2 Klone nach Behandlung mit Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.

Caco-2 hPPAR δ überexprimierende Zellen (+/+ Klon 3) induzierten durch Phytansäurekonzentrationen $\geq 50 \mu\text{M}$ ihre Proliferation. Erst bei hohen Konzentrationen trat eine leichte Hemmung des Wachstums ein. Der reprimierende Klon 7 wurde von der Phytansäurebehandlung kaum beeinflusst. Erst Konzentrationen über $200 \mu\text{M}$ inhibierten das Zellwachstum langsam. Versuche mit Zellen bei einer Phytansäurebehandlung $\geq 300 \mu\text{M}$ wurden nicht durchgeführt, da zytotoxische Effekte in diesen Bereichen nicht auszuschließen waren.

Da keine Hemmung der Proliferation in den Caco-2 hPPAR δ überexprimierenden oder -reprimierenden Klonen in den Konzentrationsbereichen bis $300 \mu\text{M}$ Phytansäure gemessen werden konnten, erfolgte keine Charakterisierung der Genprofile von bekannten Proliferationsmarkern.

7 Diskussion

Fetteiche Ernährung ist mit einer erhöhten Inzidenz von Krebserkrankungen verbunden. Hierzu gehören unter anderem auch Kolon-, Brust- und Prostatakrebs. Andererseits weisen experimentelle Studien darauf hin, dass der Konsum bestimmter Fettsäuren, zu denen auch ungesättigte Fettsäuren gehören, zur Krebsprophylaxe beitragen könnte. In beiden Fällen sind die beteiligten molekularen Wirkungsmechanismen nicht vollständig aufgeklärt. Für eine Reihe von Fettsäuren wurden tierexperimentell und in Untersuchungen an Zellkulturen antiatherogene, antikarzinogene, antidiabetische sowie anabolische Wirkungen nachgewiesen [Fritsche und Steinhart, 1998a]. Aufgrund dieser Tatsache sollten in der vorliegenden Arbeit mögliche protektive Eigenschaften von einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, z. B. den konjugierten Linolsäureisomeren (CLAs), und verzweigtkettigen Fettsäuren, im Bereich der Krebsprävention, analysiert werden. Ob diese Substanzen auch prophylaktisch oder therapeutisch bei Erkrankungen des Menschen eingesetzt und in Zukunft als funktionelle Inhaltsstoffe von Lebensmitteln Verwendung finden könnten, ist noch unklar.

Fettsäuren können mit Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) interagieren, die als Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren zu der Familie der nukleären Rezeptoren gehören. Alle drei bekannten Isoformen werden im Darm exprimiert [Braissant et al., 1996] und durch Fettsäuren struktur-spezifisch aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im *apc*-Gen von Kolonzellen zu einer Induktion des β -Catenin-TCF-4 Signalweges führt und dieser direkt mit der Induktion von *PPAR δ* assoziiert ist. Weitere Zielgene sind Marker der Proliferation, wie *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun*, die das Tumorstadium fördern. Agonisten von *PPAR δ* können zur Therapie von metabolischen Stoffwechselerkrankungen eingesetzt werden [Luquet et al., 2004]. Anhand dieser Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, inwieweit die zu untersuchenden Substanzen, u.a. die CLAs, mit *PPAR δ* interagieren können.

Das frühzeitige Erkennen des toxischen Potentials ausgewählter Substanzen und Hinweise auf molekulare Wirkungsmechanismen, sollen eine wichtige Entscheidungsgrundlage für die Auswahl von Substanzklassen zur möglichen

Anwendung als funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe sein. Erarbeitete Struktur-Aktivitätsbeziehungen sollen Hinweise auf das Anwendungspotenzial neuer Strukturen geben. Durch eine veränderte Zusammensetzung von Lipiden in der Nahrung könnte in Zukunft eine Verminderung des Kolonkrebsrisikos angestrebt werden.

7.1 Auswahl von Lebensmittelinhaltsstoffen als Modellsubstanzen

Zur Untersuchung der Ausgangshypothese, dass bestimmte Fettsäuren protektive Eigenschaften bei der Krebsentstehung haben könnten, wurden drei Kriterien für Modellsubstanzen formuliert.

Als Beispiel für eine verzweigtkettige Fettsäure wurde die Phytansäure gewählt. Sie ist strukturell analog zum kurzen verzweigtkettigen Antiepileptikum Valproinsäure. Mögliche Effekte der Phytansäure können anhand der sehr gut charakterisierten VPA abgeleitet und gedeutet werden. Phytansäure wurde bereits als RXR α - und PPAR α -Ligand beschrieben, so dass einiges darauf hindeutet, dass Phytansäure eine biologische Funktion ausüben könnte. Phytansäure reguliert den Lipidstoffwechsel und induziert eine Lipid-Akkumulation in L-Zell Fibroblasten [Atshaves et al., 2002]. Sie spielt eine wichtige Rolle beim Refsum-Syndrom, einer Peroxisomalen Stoffwechselerkrankung. Eine Einlagerung von Phytansäure in die myocardiale Phospholipidmembran könnte einen plötzlichen Herztod verursachen [Monnig et al., 2004]. Xu et al. haben vor kurzem einen Zusammenhang zwischen der Phytansäurekonzentration im Serum von Patienten mit einem erhöhten Prostatakrebsrisiko assoziiert [Xu et al., 2005]. Weiterhin führte die gleichzeitige Applikation von Phytansäure und einem RAR-Agonisten zu teratogenen Effekten in der Maus. Eine Interaktion von Phytansäure mit PPAR δ durch Heterodimerbildung über RXR, und somit ein Einfluss der Fettsäure auf das Tumorwachstum, sollte charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR δ mit der teratogenen Potenz von VPA und VPA-Derivaten korrelierte. Anhand von morphologischen und molekularen Endpunkten wurde ersichtlich, dass teratogene Substanzen eine differenzierungsfördernde Wirkung auf F9-Teratokarzinomzellen zu haben schienen. Für diese Substanzklasse konnte zusammenfassend gesagt

werden, dass verzweigtkettige Fettsäuren, wie VPA und seine Derivate, PPAR δ aktivieren, diese Aktivierung im Zusammenhang mit der Differenzierung von F9-Zellen und der teratogenen Potenz steht. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Phytansäure, als Struktur-Analoga von VPA, den gleichen Wirkungsmechanismen unterliegen könnte.

Als Modellsubstanzen für mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurden die konjugierten Linolsäureisomere herangezogen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CLAs Kolontumore inhibieren können [Liew et al., 1995; Park et al., 2001; Kohno et al., 2004]. 1999 zeigten Moya-Camarena et al., dass einige Isomere der CLAs PPAR α und PPAR γ aktivieren konnten. In anderen Studien konnten bereits antimutagene und antitkarzinogene Eigenschaften nachgewiesen werden [Whigham et al., 2000; Pariza et al. 2001; Kelly, 2001; Wahle und Heys; 2002]. Weiterhin wird intensiv diskutiert, inwieweit individuelle Isomere der konjugierten Linolsäure spezifisch wirken könnten [Pariza et al., 2001; Ochoa et al., 2004; Cho et al., 2005]. Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, sollte in dieser Arbeit die Wirkung einzelner CLA-Isomere untersucht werden. Die erste Substanz stellte das Hauptisomer in Lebensmitteln, die 9Z,11E-CLA, dar. Als Minorisomer wurde die biologisch besonders aktive 10E,12Z-CLA herangezogen, und als Beispiel für eine trans-trans Fettsäure diente die 9E,11E-CLA. Das Hauptisomer und das 10E,12Z-CLA Minorisomer wurden bereits als PPAR α Liganden charakterisiert. Da die Hypothese, dass die Rezeptor-Isoform PPAR δ an der Krebsentstehung beteiligt sein könnte, noch aktuell intensiv diskutiert wird [Ouyang et al., 2006], sollte die Interaktion der mehrfach ungesättigten Modellsubstanzen mit dem nukleären Rezeptor analysiert werden.

Die Trans-Vaccensäure sollte als Beispiel für eine einfach ungesättigte Fettsäure herangezogen werden. Sie ist vor allem als Precursor für die Bildung von CLAs durch die $\Delta 9$ -Desaturase bekannt [Santora et al., 2000]. Die mögliche Interaktion der TVA mit nukleären Rezeptoren und ihr Einfluss auf die Kolonkarzinogenese sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden. Weiterhin war von Interesse, ob die TVA selbst auch Aktivität innerhalb der hier untersuchten Signalwege zeigen und mehr als nur ein Vorläufer der CLAs sein könnte.

7.2 Zellkultursysteme zur Beurteilung der Wirkungsmechanismen von Modellsubstanzen

Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich auf die aktivierende Wirkung der bearbeiteten Fettsäuren auf die PPAR-Isomformen α und γ . In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion von PPAR δ mit den Modellsubstanzen ein zentraler Punkt sein. Um ein einheitliches Bewertungskriterium für alle Substanzen zu schaffen, wurde ein etablierter transienter Reporterassay herangezogen. Aufgrund ihrer hohen Transfektionseffizienz war die Zelllinie HEK 293 ideal für die Analyse der Rezeptoraktivierung. Die Zellen exprimieren endogen APC und haben somit eine von Natur aus geringe PPAR δ Expression.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte der Einfluss der untersuchten Testsubstanzen auf die Proliferation von Krebszellen untersucht werden. Um ein breites Spektrum von Karzinomzelllinien abzudecken, wurden die humanen Kolonkarzinomzellen Caco-2 und HT29 sowie die Teratokarzinomzelllinie F9 der Maus miteinander verglichen. Caco-2 Zellen stellen ein etabliertes Modellsystem dar und können nach Proliferation und Erreichen der Konfluenz in die Differenzierungsphase übergehen. Weiterhin haben sie durch ihre APC-Mutation eine erhöhte β -catenin Expression im Cytosol und induzieren somit die β -Catenin-TCF-4 Signalkaskade, die, nach Hypothese, mit der PPAR δ Induktion und einer Hyperproliferation der Tumorzellen in Zusammenhang stehen könnte. HT29 Zellen sind den Stammzellen des Kolons ähnlich und wachsen unter Normalbedingungen unpolar und undifferenziert, was ein entscheidendes Kriterium für Proliferationsstudien darstellte. Weiterhin exprimieren sie nur TCF-4 und waren durch dieses spezifische Merkmal ideal für die Untersuchung der β -Catenin-TCF-4 Signalkaskade und der daraus resultierenden natürlichen Hyperproliferation der Zelllinie. Die embryonale Zelllinie F9 wurde zum Spezies-Vergleich zwischen Mensch und Maus eingesetzt.

Für anschließende Differenzierungsstudien wurden die bereits erwähnten Caco-2 Zellen eingesetzt. Sie sind in der Lage, je nach Differenzierungsstadium, die bekannten Markerenzyme Alkalische Phosphatase und Saccharase-Isomaltase in ihrer Bürstensaummembran einzulagern. Weiterhin können auch die von Kolonkrebszellen bekannten Differenzierungsmarker CEA und iFABP in Caco-2

Zellen durch einen Aktivierungsassay nachgewiesen werden, was diese Zelllinie für mögliche differenzierungsfördernde Einflüsse der Modellsubstanzen präferierte.

Die Beeinflussung der Zelladhäsion und die Wirkung der Modellsubstanzen auf die Expression von Markergenen wurde, aufgrund der Spezifikation (APC^{-/-} und TCF-4), in HT29 Zellen durchgeführt. Caco-2 Zellen dienten zur weiteren Aufklärung der β -Catenin-TCF-4 Signalkaskade und zur Analyse von PPAR δ .

7.3 Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors delta (PPAR δ) durch Modellsubstanzen

Beim Füttern von Nagetieren mit dem verzweigt-kettigen Antiepileptikum Valproinsäure konnte eine verstärkte Proliferation von Peroxisomen in der Leber beobachtet werden [Horie et al., 1985; Ponchaut et al., 1991]. Als Schaltelement dieser Proliferationsinduktion wurden die sogenannten Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren charakterisiert [Forman et al., 1996; Willson et al., 1997]. Alle drei bekannten Isoformen dieser Rezeptoren (α , γ und δ) wurden von spezifischen Substanzen aktiviert und üben unterschiedliche physiologische Funktionen aus [Issemann et al., 1990; Kliewer et al., 1994; Tontonoz et al., 1994]. VPA identifizierte sich als ein PPAR δ -Aktivator, was 1999 von Lampen et al. in Zellkulturen bestätigt werden konnte. Weiterhin konnten spezifische Struktur-Aktivitäts-Beziehungen anhand von VPA-Derivaten hergestellt werden. Die PPAR δ -Aktivierung stieg mit steigender Kettenlänge.

Die gut untersuchten Ergebnisse der VPA und ihrer Derivate sollten in dieser Arbeit dazu dienen, die verschiedenen Modellsubstanzen im Bezug auf ihre mögliche PPAR δ -Aktivierung hin zu testen und eventuelle Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dieser Lebensmittelinhaltsstoffe aufzustellen. Die Aktivierung von PPAR δ durch Fettsäuren wurde anhand eines Reporterassays ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoraktivierung strukturabhängig ist. Die Trans-Vaccensäure, als Beispiel für eine einfach ungesättigte Fettsäure mit 18 C-Atomen, bewirkte nur eine schwache Aktivierung von PPAR δ . Bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöhte sich die Potenz, den Rezeptor zu aktivieren. Beide Isomere der konjugierten Linolsäure konnten ihn konzentrationsabhängig induzieren, wobei die Aktivierung durch das Hauptisomer 9Z,11E-CLA im vergleichbaren Bereich von anderen Fettsäuren lag [Lampen et al., 2001a und 2001c]. Das biologisch potente Minorisomer 10E,12Z-CLA bewirkte im Vergleich eine mehr als doppelt so starke Aktivierung. Da Trans-Vaccensäure und die CLAs beide 18 C-Atome haben und sich nur in einer Doppelbindung unterscheiden, deutet einiges auf eine strukturspezifische Aktivierung des nukleären Rezeptors hin. Weiterhin scheint die Doppelbindung in trans-cis-Stellung an Position 10 und 12 eine begünstigte räumliche Struktur für PPAR δ zu sein.

Die Phytansäure aktiviert den Rezeptor um das 7,8fache. Diese verzweigt-kettige Fettsäure ist mit 16 C-Atomen kürzer als die anderen Modells-substanzen und enthält keine Doppelbindungen, scheint allerdings durch ihre verzweigten 4 Methylgruppen im Hinblick auf die Rezeptoraktivierung potenter zu sein als die TVA.

Tabelle 7-1: Zusammenfassung der PPAR δ -Aktivierung durch 200 μ M der Modells-substanzen.

Modells-substanz	Aktivierungsfaktor
Trans-Vaccensäure	6,7
9Z,11E-CLA	8,5
10E,12Z-CLA	18,6
Phytansäure	7,8

7.4 Proliferationsstudien von Karzinomzelllinien unter Einfluss der Modells-substanzen

90-95 % der Krebserkrankungen werden auf Umwelteinflüsse zurückgeführt, wobei die Ernährung eine entscheidende Schlüsselrolle spielt. Der erste sichtbare Schritt in der Pathogenese des Kolonkarzinoms stellt die Hyperproliferation der Kolonzellen dar. Ein möglicher Mechanismus, um die fortschreitende Progression der Zellen zu verhindern, wäre die Inhibierung der Hyperproliferation.

In einigen verschiedenen Geweben konnten in vivo bereits chemoprotektive Effekte von CLAs beobachtet werden [Belury, 2002a]. Park et al. (2001) berichteten von einem durch CLA-Fütterung induzierten Rückgang von Kolonkrebs bei Ratten. Weitere in vitro Studien konnten durch Inkubation verschiedener Kulturen mit CLAs das Zellwachstum von SW 480 [O'Shea et al., 1999] und HT29 Zellen [Shultz et al., 1992; Palombo et al., 2002] hemmen, wobei der genaue Mechanismus der möglichen Chemoprotektion durch CLA genauer untersucht werden muss.

1998 konnten zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass PPAR γ -Liganden antiproliferative Effekte auf verschiedene Karzinomzelllinien ausüben konnten. Das Zellwachstum von Brustkrebs wurde unterdrückt [Elstner et al., 1998], ebenso wie das von Prostatakrebs [Kubota et al., 1998].

Da in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass einzelne Modellschubstanzen PPAR δ -Aktivatoren sind, liegt die Vermutung nahe, dass diese Fettsäuren ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf verschiedene humane Kolonkarzinomzelllinien haben könnten. Diese Tatsache korreliert weiterhin mit der Potenz der Proliferationsinhibition des PPAR δ -Aktivators VPA und dessen Derivaten.

Um die möglichen antiproliferativen Wirkungen von Fettsäuren zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Arbeit in einem Screeningverfahren die Modellschubstanzen hinsichtlich ihrer Effekte auf das Wachstum von verschiedenen Karzinomzelllinien bestimmt. Ziel dieser Untersuchungen war es, antiproliferativ wirksame Fettsäuren zu identifizieren und mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzuzeigen. Tabelle 7-2 zeigt die untersuchten Fettsäuren und ihre antiproliferativen Effekte in verschiedenen Zelllinien ausgedrückt als IC₅₀ Werte. Für fast alle ausgewählten Substanzen konnte gezeigt werden, dass sie das Wachstum in allen drei Zelllinien inhibieren. Die antiproliferativen Effekte folgten dabei einer ausgeprägten Dosis-Wirkungs-Beziehung, wobei die Konzentrationen für eine halbmaximale Wachstumshemmung sehr unterschiedlich waren. So lag die Konzentration bei der potentesten Modellschubstanz 10E,12Z-CLA zwischen 1-3 μ M je nach Zelllinie, während bei den schwächer wirksamen Fettsäuren Konzentrationen bis zu 233 μ M nötig waren, um den gleichen Effekt zu erzielen. Einzig die Trans-Vaccensäure, bekannt als Precursor für die Bildung von CLAs, zeigte keine deutlich ausgeprägte Wachstumshemmung im untersuchten Löslichkeitsbereich bis 300 μ M. Es scheint daher ein ausgeprägter Zusammenhang zwischen Struktur der Fettsäure und ihrer biologischen Aktivität zu existieren.

Tabelle 7-2: Antiproliferative Effekte der Modellschubstanzen auf verschiedene Zelllinien ausgedrückt als IC₅₀ Werte.

		Modellschubstanzen			
	Trans-Vaccensäure	9Z,11E-CLA	10E,12Z-CLA	9E,11E-CLA	Phytansäure
Caco-2	keine Effekte im Löslichkeitesbereich	82,1 μ M	3,1 μ M	233,2 μ M	50,2 μ M
HT29		21,7 μ M	1,8 μ M	58,7 μ M	40,3 μ M
F9		32,7 μ M	1,2 μ M	26,8 μ M	21,1 μ M

7.5 Analyse des toxischen Potentials der Modellsubstanzen

Um den Mechanismus der Proliferationshemmung genauer zu untersuchen, wurde das toxische Potential der in dieser Arbeit eingesetzten Modellsubstanzen ermittelt. Fast alle Vertreter der verschiedenen Fettsäuren entfalteten bei Konzentrationen bis 200 μM keine signifikante Zytotoxizität in den humanen Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und HT29. Bei höheren Konzentrationen bis zur Löslichkeitsgrenze von maximal 350 μM der Wirksubstanzen zeigten einige Vertreter Zytotoxizitätsraten von maximal 17 %. Da alle Effekte der Modellsubstanzen in deutlich niedrigeren Konzentrationsbereichen auftraten, konnte eine zytotoxische Wirkung für die Proliferationshemmung nicht verantwortlich gemacht werden. Alle zellulären und molekularen Wirkungen konnten somit als Effekte der Fettsäuren auf die Karzinomzellen betrachtet werden.

7.6 Untersuchung der Expression von Markergenen der Proliferation

Nach Bestätigung der Ausgangshypothese, dass Lebensmittelinhaltsstoffe, speziell bestimmte Fettsäuren, Einfluss auf die zellulären Mechanismen von Kolonkarzinomzellen haben, wurde diese auf die Fragestellung nach den molekularen Effekten während der Zellproliferation erweitert. Studien von O'Shea et al. zeigten 1999 einen wachstumshemmenden Effekt von CLAs in SW480 Kolonkrebszellen. Weitere Studien von anderen Arbeitsgruppen beobachteten ähnliche Wirkungen, wobei verschiedene mögliche molekulare Mechanismen für die Proliferationshemmung von CLAs diskutiert wurden. Kim et al. (2002a) zeigten eine Inhibition des insulin-like growth factor I (IGF-I) in Caco-2 Zellen durch das 10E,12Z-CLA Minorisomer. Die Aktivierung des p53-regulierten Signalweges spielte nach Kemp et al. (2003) eine zentrale Rolle bei den antiproliferierenden Effekten der konjugierten Linolsäuren. Weiterhin wurde die Wachstumshemmung, ausgelöst durch CLAs, mit dem Blockieren des Zellzyklus in der G0/G1 Phase assoziiert. Wahrscheinlich spielen weitere molekulare Mechanismen, wie der APC- β -Catenin und der PPAR δ Signalweg ebenfalls eine wichtige Rolle während der Hyperproliferation von Karzinomzellen. Hierzu wurden in dieser Arbeit beispielhaft

die als Targets des APC- β -Catenin Signalwegs identifizierten Proliferationsgene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* unter Einfluss der Modellsubstanzen in HT29 Zellen charakterisiert. Es ließ sich feststellen, dass die Trans-Vaccensäure, übereinstimmend mit ihren zellulären Effekten, keinen Einfluss auf die mRNA Expression der Proliferationsmarker hatte. Die zellulären Effekte der beiden CLA-Isomere spiegeln sich in den molekularen Effekten der Proliferationsgene wieder. *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* wurden zeit- und konzentrationsabhängig von den CLAs gehemmt. Das *c-myc* Oncogenprodukt ist ein Transkriptionsfaktor, der mit Max dimerisiert und die E-Box Sequenz erkennt und so eine Schlüsselfunktion u.a. in der Zellproliferation hat [Fujioka et al., 2001].

Die bisher vorliegenden Ergebnisse der Hemmung von Proliferationsgenen in HT29 Zellen durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren korrelierten mit den Berichten anderer Arbeitsgruppen. Durgam et al. (1997) beobachteten antiproliferative Effekte von CLAs in humanen Brustkrebszellen. Zellzyklusstudien zeigten ebenfalls den Arrest der MCF-7 Zellen in der G0/G1 Phase sowie die Inhibition der *c-myc* mRNA Expression nach CLA-Behandlung. 2002 konnten Liu et al. zeigen, dass das Hauptisomer 9Z,11E-CLA die *c-myc* und *cyclin D1* mRNA Expression auch in SGC-7901 Zellen (Magenkrebszelllinie) inhibieren konnte. Weiterhin blockierte die CLA auch hier den normalen Zellzyklus. Zusammenfassend deutet einiges darauf hin, dass die Proliferationsgene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* direkte Targets der CLAs sind.

Überdies ergaben weitere Promotorstudien in dieser Arbeit, dass die Aktivität des *c-myc* Promotors ebenfalls konzentrationsabhängig von den CLAs inhibiert werden konnte. Deutlich wurde auch hier, dass die beiden untersuchten Isomere der konjugierten Linolsäure einen unterschiedlich starken Einfluss auf die molekularen Mechanismen der Zellen auszuüben schienen. 50 μ M 10E,12Z-CLA bewirkten eine fast doppelt so starke Hemmung des *c-myc* Promotors als die vergleichende Konzentration des biologischen Hauptisomers 9Z,11E-CLA.

Die Beteiligung von *c-jun* am Zellzyklus und die Hemmung der *c-jun* mRNA Expression durch CLAs während der Zellproliferation sollte anhand des *AP1* Promotors verifiziert werden. In dieser Studie konnte eine sehr gute Korrelation

zwischen der konzentrationsabhängigen Hemmung der Genexpression und der *AP1* Promotoraktivität hergestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie die CLAs, spezifische Einflüsse auf die untersuchten molekularen Marker der Proliferation ausüben. Diese positiven Effekte könnten als anti-Krebs Effekte gedeutet werden, da *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* u.a. als downstream Targetgene des APC Signalweges identifiziert wurden [He et al., 1998 und 1999].

Auch verzweigkettige Fettsäuren zeigten einen Einfluss auf die Proliferation der HT29 Zelllinie. In dieser Arbeit konnte herausgestellt werden, dass die Modellsubstanz Phytansäure alle drei Proliferationsgene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* konzentrations- und zeitabhängig hemmen konnte. Diese Beobachtung korrelierte mit den Daten der Promotorstudien von *c-myc* und *AP1*. Festzustellen war allerdings in Übereinstimmung mit den ermittelten zellulären Effekten der Phytansäure, dass, verglichen mit den CLAs, höhere Konzentrationen benötigt wurden, um ähnliche Effekte auf die molekularen Strukturen der Proliferation zu erzielen. Diese Tatsache weist einmal mehr darauf hin, dass auch hier bestimmte Struktur-Wirkungs-Beziehungen Einfluss auf die Proliferation von Karzinomzellen haben müssen. Spezifische Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Aktivität sind deutlich geworden.

7.7 Wirkungen der Modellsubstanzen auf die Differenzierung

Weitere Mechanismen über die Lebensmittelinhaltsstoffe, wie bestimmte Fettsäuren, ihre antiproliferative Wirkung entfalten könnten, wäre die Stimulation der Differenzierung. In der Kolonkarzinogenese sind gerade diese Mechanismen gestört. Hyperproliferierende Zellen sind durch ihre Dedifferenzierung gekennzeichnet, was schließlich auch maßgeblich an der fortschreitenden Transformation der Zellen ist. Ein neuer Ansatz in der Krebstherapie ist die Induktion der Differenzierung zur Bekämpfung des Tumorwachstums. Durch die Induktion der Differenzierung soll die Hyperproliferation der Zellen verlangsamt werden. Eine Wachstumsinhibierung der Kolonkarzinomzelllinien HT29 und Caco-2 durch die Behandlung mit den in dieser Arbeit getesteten Modellsubstanzen könnte somit die Folge einer Induktion der Differenzierung sein.

Aufgrund dieser Hypothese sollten die differenzierungsfördernden Eigenschaften der proliferationshemmenden CLAs und der Phytansäure untersucht werden. Für die beiden Vertreter der mehrfach ungesättigten Fettsäuren konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der spezifischen Intestinalen Alkalischen Phosphatase Aktivität in Caco-2 Zellen gemessen werden. Dieser Marker der Differenzierung lagert sich je nach Grad der Differenzierung in die Bürstensaummembran der Zelle ein und kann so enzymatisch bestimmt werden. Ganz eindeutig erkennbar war die starke differenzierungsfördernde Eigenschaft des biologisch potenteren CLA-Minorisomers. 100 μ M 10E,12Z-CLA induzierten das Enzym Intestinale Alkalische Phosphatase in den Kolonkarzinomzellen 3mal stärker als die 9Z,11E-CLA bei gleicher Konzentration. Mariadason et al. (2001) zeigten, dass die Inhibition des β -Catenin-TCF-4 Signalwegs mit der Förderung eines differenzierenden Phenotypes von Kolonepithelzellen assoziiert ist. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die Promotoraktivitäten von 4 weiteren Genen der Zelldifferenzierung in Caco-2 Zellen nach Erreichen der Konfluenz zeitabhängig anstiegen. Aufgrund dieser Tatsache sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden, inwieweit die ausgewählten CLA-Isomere die Promotoren der identifizierten Differenzierungsmarker, *IAP*, *SI*, *CEA* und *iFABP*, aktivieren können. Die Ergebnisse zeigten erstmals eindeutig, dass einzelne CLA-Isomere die Differenzierung von Caco-2 Zellen induzieren konnten. 5 μ M 10E,12Z-CLA aktivierten den *IAP* Promotor um den Faktor 4,3. Für einen identischen Effekt musste die 20fache Konzentration

des Hauptisomers 9Z,11E-CLA eingesetzt werden. Die Analyse des *CEA* Promotors deutete auf übereinstimmende Ergebnisse hin. 100 μM 9Z,11E-CLA bewirkten eine 2,4fache Aktivierung des Promotors, wohingegen nur $< 5 \mu\text{M}$ des Minorisomers den gleichen Einfluss hatten. Erstaunlicherweise korrelierten die jeweiligen Konzentrationsbereiche, in denen die beiden CLA-Isomere differenzierungsfördernde Eigenschaften zeigten, mit den IC_{50} Werten der Proliferationshemmung. Es konnte daher gesagt werden, dass die nicht-zytotoxische wachstumshemmende Wirkung der CLAs auf die Caco-2 Zellen von einer Differenzierungsinduktion begründet wurde. Die weiteren Differenzierungsmarker *SI* und *iFABP* wurden ebenfalls von den beiden Fettsäuren konzentrationsabhängig beeinflusst, was die aufgestellte Arbeitshypothese weiter unterstützt. Beim Betrachten der bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit ist es naheliegend, dass konjugierte Linolsäuren als Nahrungskomponenten von großem Interesse für die Krebsprävention sein können. Im weiteren Verlauf dieser Studie sollte herausgearbeitet werden, ob verzweigtkettige Fettsäuren ähnlichen molekularen Mechanismen folgen. Interessanterweise hatte die Modellsubstanz Phytansäure im Konzentrationsbereich der CLAs eine leichte Hemmung der Enzymaktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase zur Folge. 50 μM Phytansäure inhibierten die Aktivität um ca. $\frac{1}{4}$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Zum Vergleich: der IC_{50} Wert der Proliferationshemmung lag in Caco-2 Zellen ebenfalls bei 50,2 μM . Es deutet einiges darauf hin, dass die Wachstumsinhibition der Zellen nicht ausschließlich durch eine eintretende Differenzierungsförderung der Phytansäure begründet wurde. Für genauere Hinweise wurden die Promotorstudien der bekannten Marker *IAP*, *SI*, *CEA* und *iFABP* herangezogen. Die Promotorregion des *CEA* Gens wurde durch die Phytansäure leicht induziert, während die *SI*- und *iFABP*-Promotoren nicht beeinflussbar waren. Der *IAP*-Promotor wurde aktiviert, wobei eine Aktivierung, vergleichbar der der 9Z,11E-CLA, erst bei 250 μM erkennbar war. Die Konzentration der Phytansäure war somit 2,5mal höher als die der 9Z,11E-CLA und hatte keinen Zusammenhang mit dem IC_{50} Wert der Proliferationshemmung. Es kann festgestellt werden, dass die Phytansäure, als Vertreter der verzweigtkettigen Fettsäuren, im Gegensatz zu den CLAs, anderen molekularen Mechanismen folgen könnte. Die Wachstumshemmung der Kolonkarzinomzellen durch Phytansäure ist nicht primär mit einer eintretenden differenzierungsfördernden Eigenschaft der Fettsäure belegbar.

7.8 Analyse der β -Catenin-TCF-4 Signalkaskade

Der APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweg wird in Zusammenhang mit der Kolonkarzinogenese diskutiert. Seit einiger Zeit wird vermutet, dass das β -Catenin Protein eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des Kolonkarzinoms spielt [Peifer et al. 1996]. 1998 untersuchten Mann et al. unterschiedliche Kolorektale Karzinomzelllinien und Gewebe und stellten eine übereinstimmende Überexpression von *β -catenin* fest. Morin et al. konnten 1997 zeigen, dass bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polypose die intrazelluläre Konzentration des β -Catenins in Darmepithelzellen stark erhöht ist. Diese Erkrankung stellt eine Prädisposition zum Darmkrebs dar und wird durch Mutation des *apc*-Gens hervorgerufen. In der Mehrzahl der Fälle von Dickdarmkrebs war das *apc*-Gen mutiert und schien somit in kausalem Zusammenhang mit der Tumorentstehung zu stehen [Kinzler und Vogelstein, 1996]. Ist das *apc*-Gen mutiert, kann der Abbau des β -Catenin nicht mehr erfolgen, und es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären β -Catenin Konzentration im Cytosol. Bereits 1990 konnten Fearon und Vogelstein die Komplexbildung von freiem β -Catenin mit dem T-Zell Faktor 4 (TCF-4) nachweisen. 1996 entdeckten Behrens et al., dass das β -Catenin nach Komplexbildung mit DNA-bindenden Proteinen aus der T-Zell factor (TCF)/Lymphoid-enhancer-binding-factor (LEF)-Familie als Transkriptionsfaktor fungiert. Diese Vermutung und die Tatsache, dass das APC-Protein den intrazellulären β -Catenin-Gehalt niedrig hält, belegen die Bedeutung des APC-Proteins als negativen Regulator der Wnt-Signalkaskade, deren übermäßige Aktivierung zur Krebsentwicklung führt [Peifer et al., 1999; Lustig et al., 2003]. Wang et al. demonstrierten 2004, dass PPAR δ , durch Crosstalk zwischen Prostaglandinen und Wnt-Kaskade, ein entscheidender Punkt in der Tumorentstehung ist.

TCFs, zu denen TCF-1, 3 und 4 sowie LEF-1 gehören, sind T-Zell spezifische Transkriptionsfaktoren mit einer hoch konservierten high-mobility group (HMG) Box von 80 Aminosäuren, die als Monomer an DNA sequenzspezifisch binden [Giese et al. 1995]. β -Catenin bindet durch Armadillo Repeats an die konservierte N-terminale TCF-Region [Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996]. TCFs zeigen keine eigene Transkriptionsaktivität und benötigen somit Co-Aktivatoren wie β -Catenin. β -Catenin selber kann unabhängig von TCF-4 agieren. Eine Korrelation zwischen der Funktion

von β -Catenin im Wnt Signalweg und der Möglichkeit der Transaktivierung konnte von van de Wetering et al. 1997 hergestellt werden.

TCF-4 wurde in diversen Kolonkarzinomzellen wie HT29 und HCT116 exprimiert [Korinek et al., 1997]. Im Kernextrakt von HT29-APC Zellen ($APC^{-/-}$) lag TCF-4 verstärkt vor und bildete Komplexe mit dem β -Catenin. Sobald in HT29-APC Zellen das APC-Protein durch Zn^{2+} induziert wurde, verschwand die β -Catenin-TCF-4 Bande im Gel. Von der Arbeitsgruppe um Hans Clevers konnte demnach bewiesen werden, dass nur der T-Zell Faktor 4 in Kolonkarzinomzellen exprimiert wird und dass weiterhin die Interaktion von β -Catenin mit TCF-4 durch APC reguliert ist.

Wie bereits erläutert, sind *c-myc* und *cyclin D1* β -Catenin-TCF-Targetgene und regulieren die Progression des Zellzyklus und die Proliferation von Zellen. Shtutman et al. konnten 1999 eindeutig belegen, dass der β -Catenin-TCF-Komplex durch Bindung an den *Cyclin D1* Promotor die Expression des Cyclin D1 Proteins in SW480 Zellen stimuliert. Transfektionen dieser Zellen mit dem Wildtyp-APC-Gen führten über die Stimulation des Abbaus von freiem β -Catenin zur Reduktion der *cyclin D1* Expression. Mann et al. konnten 1999 die direkte Interaktion des β -Catenin-TCF-4 Komplexes mit der Promotorregion von *c-jun* beweisen. Die Expression des Protooncogens *c-myc* wurde durch die Zufuhr von wt-APC gehemmt, während die Transkription dieses Markers direkt von TCF-4 reguliert wurde. β -Catenin akkumulierte mit dem Gen durch die TCF-4 Bindungsstellen im *c-myc* Promotor [He et al., 1998].

Zusammenfassend belegen die Untersuchungen eindeutig, dass das β -Catenin ein Oncoprotein ist und dass das APC-Protein ein wichtiger physiologischer Antagonist des β -Catenins und damit auch der APC- β -Catenin-TCF Signalkaskade ist. Die Kontrolle der β -Catenin-TCF-4 Signalinduktion ist ein bedeutender Part der APC-Funktion [Kinzler und Vogelstein, 1996]. Bei Zerstörung dieser Funktion kann es zu frühen Ereignissen in der malignen Transformation von Zellen kommen.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass einige ausgewählte Modellsubstanzen die zelluläre Proliferation von Kolonzellen hemmten und molekulare Marker, wie u.a. *cyclin D1* ebenfalls inhibiert wurden, sollte geklärt

werden, inwieweit die Modellsubstanzen in die beschriebene APC- β -Catenin-TCF Kaskade eingreifen könnten. Für diese Studie wurde die bis zu diesem Zeitpunkt potenteste Modellsubstanz der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die 10E,12Z-CLA, verwendet. Hierzu erfolgten Transfektionen der einzelnen Komponenten der APC- β -Catenin-TCF Signalkaskade in Caco-2 Zellen. Diese Zelllinie bringt eine natürliche APC-Mutation mit und kann somit auch eine künstliche Überexpression von β -Catenin nicht proteosomal degradieren. Es konnte gezeigt werden, dass die 10E,12Z-CLA in die Signalkaskade eingreifen konnte. Deutlich erkennbar war, dass beim Vorhandensein von Wildtyp- β -Catenin in den Zellen höhere Fettsäurekonzentrationen benötigt wurden, um eine Hemmung der Signalkaskade einzuleiten. Das β -Catenin konnte vom mutierten APC-Protein der Caco-2 Zellen nicht abgebaut werden, lag in erhöhten Konzentrationen im Cytosol vor und begünstigte somit die Affinität der Komplexbildung mit TCF-4. Wurde das β -Catenin als mutierte Form in die Zellen transfiziert, dann wurde die Komplexbildung mit dem T-Zell Faktor 4 unterbunden. Aus diesem Grund reichten geringe Fettsäurekonzentrationen aus, um eine induzierte Hemmung des Signalwegs zu erreichen. TCF-4 alleine hatte keine transkriptionelle Aktivität.

Wurde bei Expression des wt β -Catenins im nächsten Schritt die TCF-4 Komponente verändert, so ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der hemmenden Potenz der 10E,12Z-CLA. Egal, ob das wt TCF-4 oder die mutierte Form von der Zelle exprimiert wurde, die inhibierende Wirkung der CLA trat ab 10 μ M ein. Diese Beobachtung korrelierte mit den oben gewonnen Erkenntnissen, dass TCF-4 selber unwirksam ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Hauptschaltelement der APC- β -Catenin-TCF-4 Signalkaskade in APC^{-/-} Kolonkarzinomzellen das β -Catenin Protein ist. Steigt die Konzentration des freien β -Catenins im Cytosol an, kommt es zu einer Aktivierung der Komplexbildung mit dem T-Zell Faktor 4 und somit zu einer Induktion von Targetgenen, wie u.a. *cyclin D1*. Weiterhin kann die Modellsubstanz auf das als Hauptelement der Signaltransduktionskaskade identifizierte β -Catenin Einfluss nehmen und die Aktivität hemmen. Diese Ergebnisse implizieren weitergehend auch eine Korrelation zwischen zellulärer Proliferationshemmung, Inhibition der Targetgene des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalwegs und des induzierten β -Catenin Abbaus durch konjugierte Linolsäureisomere.

7.9 Expressionsprofile des Zelladhäsionsmoleküls β -Catenin

Die Zelladhäsion ist von erheblichem Interesse, weil sie eine weitere potentielle Rolle bei der Entwicklung von Kolonkrebs spielen könnte. β -Catenin war, wie bereits beschrieben, eine wichtige Komponente im APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweg. Weiterhin ist bekannt, dass das β -Catenin Protein auch als interzelluläre Fraktion fungiert, die die Verknüpfung der Adhäsionsmoleküle der Cadherinklasse mit den Actinfilamenten des Cytoskeletts bewerkstelligt und somit die Zell-Zell-Adhäsion und den Zusammenhalt zwischen Zellen ermöglicht. In der Krebstherapie könnte also versucht werden, durch Überexpression des cytosolischen Cadherin-Teils das β -Catenin abzufangen, so dass es nicht mehr zur Komplexbildung mit TCF-4 beitragen kann. Dove et al. untersuchten diese Möglichkeit 1995 anhand der sogenannten Min-Maus, die ein mutiertes APC-Gen hat und ein ähnliches Syndrom darstellt, wie die Ausprägung der humanen familiären adenomatösen Polypose.

Einen anderen Ansatz sollte diese Arbeit verfolgen. Es konnte bereits klar gezeigt werden, dass die potenteste Modellsubstanz, 10E,12Z-CLA, einen hemmenden Einfluss auf die β -Catenin Komponente in der APC- β -Catenin-TCF-4 Signalkaskade nehmen kann und ebenfalls die Expression von Targetgenen dieser Kaskade inhibiert.

Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, ob bestimmte Fettsäuren direkten Einfluss auf die molekularen Mechanismen von Kolonkarzinomzellen und die Genregulation von β -Catenin haben. In unbehandelten HT29 Zellen stieg die *β -Catenin* mRNA Expression kontinuierlich in Abhängigkeit der Zeit an. Beide untersuchten CLA-Isomere bewirkten eine konzentrations- und zeitabhängige Hemmung von β -Catenin. Schon nach kurzer Zeit (6 h) war zu erkennen, dass das Minorisomer 10E,12Z-CLA erneut deutlich potenter war als sein biologisches Hauptisomer und die *β -Catenin* mRNA Expression um $\frac{1}{3}$ stärker hemmte.

Die Phytansäure bewirkte ebenfalls eine Inhibition der Genexpression, die allerdings im Zeitverlauf erst erheblich später zu detektieren war. Die Konzentrationsbereiche, in denen die verzweigt-kettige Fettsäure interagiert und eine Reduktion der β -Catenin Expression auslöst, waren im Durchschnitt mit denen der 9Z,11E-CLA vergleichbar.

7.10 Proteinbiochemische Untersuchungen zur Zelladhäsion

Dass das Zelladhäsionsmolekül β -Catenin eine entscheidende Rolle in verschiedenen zellulären und molekularen Zellmechanismen spielen musste und von einigen Lebensmittelkomponenten offenbar beeinflusst werden kann, wurde in dieser Arbeit bereits herausgestellt. Nach der Analyse des APC- β -Catenin Signalweges und der *β -Catenin* mRNA Expression sollte abschließend der Einfluss der Modellsubstanzen auf das β -Catenin Protein selber charakterisiert werden. Western Blot Analysen von HT29 Zellen machten deutlich, dass die beiden konjugierten Linolsäureisomere einen signifikanten Abbau des β -Catenins induzierten. Dieser war stark konzentrationsabhängig und trat bereits erstmals nach 24 h auf. In Korrelation mit den Genexpressionsmustern erwies sich die 10E,12Z-CLA abermals als potentester Kandidat unter den Modellsubstanzen.

Die proteinbiochemischen Analysen der mit Phytansäure behandelten HT29 Zellen machten keinen signifikanten Unterschied in der β -Catenin Expression sichtbar. Auf Proteinebene konnte die verzweigt-kettige Fettsäure keinen entscheidenden Abbau des Zelladhäsionsmoleküls bewirken. Die zusammenfassenden Ergebnisse der Phytansäure erlauben den Schluss, dass diese proliferationshemmende Fettsäure weder eindeutig die Differenzierung fördert, noch die Zelladhäsion auf genetischer oder proteinbiochemischer Ebene stark beeinflussen kann. Diese Modellsubstanz folgt aller Voraussicht nach anderen biologischen Mechanismen, die im Weiteren näher untersucht werden müssen.

7.11 Einfluss der Modellsbstanzan auf den nukleären Rezeptor PPAR δ

Die Entstehung von Kolonkarzinomen wird in der Literatur auf eine Mutation im APC-Tumorsuppressorgen und einer erhöhten Aktivität des β -Catenin-TCF-4 Signalweges zurückgeführt. Der auf diese Weise begünstigte β -Catenin-TCF-4 Komplex induziert eine Reihe von Genen der Zellproliferation wie *c-myc* [He et al., 1998] und *cyclin D1* [Shtutman et al., 1999].

Ein weiteres Target in dieser Signalkaskade stellt der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor δ dar. Er ist an der Lipidoxidation und der Zellproliferation beteiligt [Takahashi et al., 2005]. Die Arbeitsgruppe um Kinzler identifizierte 1999 PPAR δ als ein direktes Target des β -Catenin-TCF-4 Komplexes. PPAR δ gehört zu den Liganden-abhängigen nukleären Rezeptoren [Mangelsdorf et al., 1995], die die Zielgenexpression durch Bindung an DNA-Erkennungssequenzen, die als PPAR-response elements (PPRE) bezeichnet werden, regulieren. Auf diese Weise kontrollieren diese Transkriptions-Aktivatoren verschiedene Aspekte des Zellwachstums, der Entwicklung und Homöostase. 2004 zeigten Reed et al., dass der Rezeptor nicht direkt von β -Catenin reguliert wird. Als Liganden der PPARs wurden u.a. Eicosanoid-Metabolite wie Prostaglandine identifiziert. Weiterhin konnte Kinzler zeigen, dass nichtsteroidale antiinflammatorische Wirkstoffe (NSAIDs) wie Sulindac die Tumorentstehung und das Wachstum inhibieren konnten. NSAIDs blockieren die Cyclooxygenasen und damit die Bildung der Prostaglandine. Prescott et al. (1996) zeigten weiter, dass Prostaglandine über einen autokrinen und/oder parakrinen Mechanismus die Entstehung von Dickdarmkrebs fördern können. Erstaunlicherweise bindet Sulindac, als nicht COX-Inhibitor, dennoch an PPAR δ und verhindert dadurch die Bindung an DNA-Erkennungssequenzen. Sulindac kann so die β -Catenin-vermittelte Erhöhung der PPAR δ -Aktivität unterdrücken [He et al., 1999]. Möglicherweise könnten COX-Inhibitoren, die gleichzeitig auch potente PPAR δ -Inhibitoren sind, zur erfolgreichen Chemoprävention des Dickdarmkrebses eingesetzt werden [Piazza et al., 1997].

Das β -Catenin-TCF-4 Heterodimer induziert die Expression von *PPAR δ* in Karzinomzellen. Weiterhin konnten Mariadason et al. (2001) zeigen, dass die β -Catenin-TCF-4 Aktivität in der Proliferationsphase von Caco-2 Zellen stark erhöht ist. Nach Erreichen der Konfluenz vermindert sich die Aktivität während der Differenzierungsphase. Die subkutane Injektion von Krebszellen mit hoher β -Catenin-TCF-4 transkriptioneller Aktivität und *PPAR δ* Expression induziert Tumore. Im Gegensatz dazu zeigen *PPAR δ* -null Zellen diese Aktivität nicht [Park et al. 2001].

7.11.1 *PPAR δ* Expression in HT29 Zellen

Nach diesen beiden miteinander vereinbaren Hypothesen sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob die Modellsubstanzen möglicherweise potente *PPAR δ* -Inhibitoren sein könnten und zusätzlich zur Hemmung von β -Catenin auch den Rezeptor direkt beeinflussen können.

Es konnte gezeigt werden, dass die *PPAR δ* mRNA-Expression in humanen HT29 Zellen während der Proliferationsphase kontinuierlich anstieg. Eine Behandlung der Zellen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren machte deutlich, dass beide CLA-Isomere die *PPAR δ* Expression hemmen konnten. Diese Hemmung folgte einer ausgeprägten Dosis-Wirkungs-Beziehung und machte ebenfalls erkennbar, dass auch hier das Minorisomer 10E,12Z-CLA potenter zu sein schien. Die Inhibition der Rezeptorexpression durch die Modellsubstanzen könnte auf einen präventiven anti-Krebs Effekt von mehrfach ungesättigten Fettsäuren hindeuten. Diese Tatsache unterstützte weiterhin die Ergebnisse der Studien zur zellulären Proliferation und Hemmung der Targetgene des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges durch die Modellsubstanzen.

Auch die verzweigtkettige Modellsubstanz konnte die Expression des Peroxisomalen Proliferator-aktivierten Rezeptor hemmen. Der Einfluss der Phytansäure war allerdings erst > 48 h signifikant detektierbar und zeigte erst ab Konzentrationen > 25 μ M erkennbare Unterschiede zu unbehandelten Kontrollzellen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Potenz der Phytansäure, Einfluss auf die Genexpression von *PPAR δ* zu nehmen, mit den Ergebnissen der vorangegangenen Studien korreliert. Phytansäure scheint nicht die wirksamste Struktur für einen Einsatz als präventives anti-Krebs Therapeutikum zu sein.

7.11.2 Generation von Caco-2 PPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Klonen

Die intensiv diskutierte Rolle von PPAR δ in der Kolonkarzinogenese sollte in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Wie bereits belegt, induziert die Injektion von Krebszellen mit erhöhter PPAR δ -Expression Tumore [Park et al., 2001]. Weiterhin erklärt Shao et al. (2002) die mögliche tumorpromovierende Rolle von PPAR δ durch die Tatsache, dass der Rezeptor ein Ziel im Ras-Signalweg darstellt.

Andere Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor δ bei der Regulation der Proliferation von Bedeutung ist [Grimaldi et al., 2001]. Um diese Hypothese zu verfolgen, wurden für diese Arbeit Caco-2 PPAR δ überexprimierende und reprimierende Klone generiert. Durch Vergleich von Proliferation, Genexpression, Differenzierung und möglicher Apoptose der unterschiedlichen PPAR δ Klone mit Wildtyp-Zellen sollte die Rolle des Rezeptors in der Kolonkarzinogenese charakterisiert und geklärt werden.

7.11.2.1 Proliferationsvergleiche der Caco-2 Klone

Nach der Generation der Rezeptor-überexprimierenden und reprimierenden Caco-2 Klone konnte festgestellt werden, dass der PPAR δ +/+ Klon 3 eine deutlich erhöhte PPAR δ Expression zeigte als Wildtyp-Zellen. Bei der Untersuchung der reprimierenden Klone konnte mit dieser Methode keine vollständige Hemmung des Rezeptors erreicht werden. Ein möglicher Knock-down könnte in Zukunft mit der siRNA Methode besser erzielt werden, konnte aber in dieser Arbeit nicht mehr zur Anwendung kommen. Der Caco-2 PPAR δ DN Klon 7 schien für diese Studie dennoch am geeignetesten und wurde für weitere Vergleichsstudien herangezogen.

Falls PPAR δ eine Rolle bei der Entstehung der Kolonkarzinogenese zukommt, sollte nach der Arbeitshypothese die PPAR δ Überexpression einen Effekt auf die Proliferation der Caco-2 Klone zeigen. Die Behandlung der PPAR δ +/+ Klon 3 Zellen mit den mehrfach ungesättigten Modellsubstanzen zeigte bei geringen Konzentrationen eine verstärkte Proliferation. In höheren Konzentrationsbereichen

erfolgte eine Hemmung des Wachstums. Die mit dem Programm TableCurve 2D berechneten IC_{50} Werte für die halbmaximale Wachstumsinhibition machten deutlich, dass die IC_{50} Konzentration in PPAR δ +/+ Klon 3 Zellen für beide CLA-Isomere wesentlich höher lag als bei vergleichenden Behandlungen von Wildtyp-Zellen. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass die IC_{50} Konzentrationen in reprimierenden PPAR δ DN Klon 7 Zellen weit unter denen des Rezeptor-überexprimierenden Klon 3 lagen. Ein direkter Vergleich von reprimierenden Zellen mit dem Caco-2 Wildtyp konnte nur schwer erfolgen, da, wie bereits erwähnt, kein vollständiger Rezeptor-Knockout erzielt werden konnte. Es bleibt also festzuhalten, dass bei einer Überexpression von PPAR δ in den Zellen eine höhere CLA-Konzentration benötigt wird, um eine Inhibition der Proliferation zu bewirken. Wenn Caco-2 PPAR δ DN Klon 7 Zellen mit dem potenteren Minorisomer 10E,12Z-CLA inkubiert wurden, wurde dieser Effekt noch deutlicher.

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Hemmung der Caco-2 Proliferation durch CLAs von der Expression des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors δ abhängig ist. PPAR δ ist offenbar für die Proliferation von Darmzellen besonders wichtig. Eine anfängliche Proliferationssteigerung der PPAR δ +/+ Klon 3 Zellen durch CLA-Behandlung bestätigt dieses. Erst hohe CLA-Konzentrationen leiten eine Wachstumsinhibition ein. PPAR δ könnte demnach eine proliferationsfördernde Wirkung zugesprochen werden. Weiterhin korrelieren diese Ergebnisse mit der Hemmung der HT29 Zellproliferation durch die beiden CLA-Isomere einhergehend mit der deutlichen Inhibition der PPAR δ Expression in humanen Kolonzellen.

Behandlungen der Caco-2 PPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Zellen mit der Modellsubstanz Phytansäure zeigten eine ausgeprägte Proliferationssteigerung im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Die PPAR δ DN Klon 7 Zelllinie blieb weitestgehend unbeeinflusst von der steigenden Phytansäurebehandlung. Ob Fettsäurekonzentrationen oberhalb der Löslichkeitsgrenze eine halbmaximale Wachstumshemmung hervorrufen könnten, konnte zellulär nicht nachgewiesen werden. Verzweigt-kettige Fettsäuren scheinen demnach eine proliferationsstimulierende Wirkung im Bezug auf den Rezeptor zu haben.

7.11.2.2 Genexpressionsstudien der Targets des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges in PPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Caco-2 Klonen

Zur Unterstützung der Proliferationsprofile von Caco-2 PPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Zellen sollten im weiteren Verlauf der Arbeit die mRNA-Expressionen der Targetgene des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges, *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun*, analysiert werden. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Expressionen der 3 Proliferationsmarker in unbehandelten Caco-2 PPAR δ +/+ Klon 3 Zellen stärker waren als in dem reprimierenden Klon 7 oder Caco-2 Wildtyp-Zellen. Nach Behandlung der 3 Zelllinien mit dem potenteren Minorisomer 10E,12Z-CLA wurden die Induktionen der Proliferationsgene zeitabhängig gehemmt. Dabei lagen die Expressionsprofile der Marker in Caco-2 PPAR δ +/+ Klon 3 Zellen überwiegend über denen der Caco-2 Wildtyp-Zellen. Je mehr PPAR δ in den Zellen exprimiert wurde, umso stärker proliferierten die Zellen. Die Expression der Proliferationsmarker wurde durch PPAR δ induziert. Weiterhin mussten höhere Fettsäurekonzentrationen eingesetzt werden, um eine Hemmung der Genexpressionen in +/+ Klon 3 Zellen zu erreichen, was mit den zellulären Beobachtungen der Proliferationsstudien korreliert.

Da die verzweigtkettige Phytansäure keine Wachstumshemmung der Klone im Löslichkeitsbereich erzielen konnte, wurde diese Modellsubstanz nicht im Hinblick auf die mRNA-Expressionen der Proliferationsgene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* untersucht.

7.11.2.3 Einfluss von PPAR δ auf die Differenzierung der Caco-2 Klone

Der Einfluss des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor δ auf die Differenzierung wurde bereits 2001 von Werling et al. am Beispiel der F9 Teratokarzinomzellen der Maus analysiert. Das Antiepileptikum Valproinsäure konnte die Differenzierung von F9 Zellen, die nachweislich eine starke PPAR δ -Expression haben, induzieren. Bei einer PPAR δ Depletion durch antisense RNA reduzierte sich dieser Effekt. Aufgrund dieser Tatsache wurde der Rezeptor als Differenzierungsvermittler in F9 Zellen diskutiert. VPA als PPAR δ aktivierende Substanz stimuliert die Differenzierung, so dass die Rezeptoraktivierung in Zusammenhang mit der steigenden Differenzierung stehen könnte. Burdick et al. zeigten 2006, dass eine Liganden-induzierte PPARdelta Aktivierung eine terminale Differenzierung von Keratinozyten auslöste. Für die in dieser Arbeit analysierten Fettsäuren konnte bereits eine konzentrationsabhängige PPAR δ -Aktivierung nachgewiesen werden. Nach der aufgestellten Hypothese sollte nun geklärt werden, ob die Modellsubstanzen die Differenzierung in Abhängigkeit der PPAR δ -Expression in humanen Kolonkarzinomzellen beeinflussen können.

Weiterhin ist die Ausprägung des Kolonkarzinoms durch eine Hyperproliferation und Dedifferenzierung von Zellen gekennzeichnet. In dieser Arbeit konnte bereits die Hypothese bestätigt werden, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie CLAs proliferationshemmend wirken und die Differenzierung von Caco-2 Zellen induzieren. Weiterhin spielt PPAR δ u.a. als Target des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges eine entscheidende Rolle in der Kolonkarzinogenese und ist in Krebszellen überexprimiert. Fettsäuren, wie die Modellsubstanzen der CLAs, können die PPAR δ mRNA-Expression hemmen und die erhöhte Proliferation von Caco-2 PPAR δ überexprimierenden Zellen inhibieren.

Ob der Rezeptor auch einen direkten Einfluss auf die Differenzierung während der Pathogenese des Kolonkarzinoms hat, sollte im Folgenden durch Promotorstudien der Intestinalen Alkalischen Phosphatase in Caco-2 PPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Klonen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität der *IAP* in Caco-2 PPAR δ +/- Klon 3 Zellen durch die Behandlung mit CLAs konzentrationsabhängig anstieg und signifikant höher lag als in

vergleichbaren Caco-2 Wildtyp-Zellen. Das Minorisomer 10E,12Z-CLA war weiterhin 10fach potenter als das biologische CLA-Hauptisomer. Interessanterweise zeigten die CLAs in PPAR δ DN Klon 7 Zellen keine differenzierungsfördernden Eigenschaften. Diese Tatsache korreliert mit der für VPA in F9 Zellen aufgestellten Bedeutung, dass der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor δ entscheidend für die Differenzierung ist. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor δ auch in der Kolonkarzinogenese eine große Rolle spielen muss.

7.11.2.4 Bedeutung der Apoptose in der Kolonkarzinogenese

CLAs als Modellsubstanzen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind als Proliferationshemmer identifiziert worden und können ebenfalls die Differenzierung von humanen Caco-2 Zellen stimulieren. Der durch Mutation im *apc*-Gen induzierte APC- β -Catenin-TCF-4 Komplex aktiviert die Expression von Genen der Proliferation und PPAR δ . Auf diese Weise kommt es zur Stimulation der Zellproliferation und möglicherweise zur Inhibition der Apoptose. Nach dieser Hypothese könnte eine PPAR δ Überexpression die Apoptose der Zellen verhindern [Maggiore et al., 2004; Pesant et al., 2006]. Knutsen et al. konnten 2005 in einem in vivo *Apc*^(Min/+) Mausmodell zeigen, dass die steigende PPAR δ Expression mit einer reduzierter Apoptose korreliert. Konjugierte Linolsäuren konnten bereits die Apoptose in SW480 [Miller et al., 2002] und Caco-2 [Kim et al., 2002b] induzieren. Ochoa et al. (2004) konnten zeigen, dass speziell das 10E,12Z-CLA Isomer bevorzugt für die Modulation der Apoptose und der Zellzykluskontrolle in PC-3 Zellen (human prostatic carcinoma cell line) verantwortlich ist. Es hemmt die bcl-2 Proteinexpression (anti-Apoptose Oncogenprodukt) und induziert p21^{WAF1/CP1}, ein Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor, der verantwortlich für die Zellteilung ist. Das biologische Hauptisomer 9Z,11E-CLA hingegen beeinflusst den Arachidonsäuremetabolismus und zeigt keine Effekte auf die Apoptose in PC-3 Zellen. Cho et al. (2003) erreichten eine Stimulation der Apoptose in HT29 Zellen durch ein CLA-Gemisch. Das 10E,12Z-CLA Isomer war am Mechanismus der Caspase-abhängigen Apoptoseinduktion in MIP-101 Zellen (humane Kolorektale Karzinomzelllinie) beteiligt [Palombo et al., 2002].

Um den Einfluss des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor δ auf die Apoptose zu analysieren, wurde hier die Caspase-3 Aktivität als Indikatorenzym der frühen Apoptose nach konzentrationsabhängiger 10E,12Z-CLA Behandlung von Caco-2 Wildtyp Zellen und PPAR δ überexprimierenden sowie reprimierenden Klonen gemessen. Die Enzymaktivität in PPAR δ DN Klon 7 Zellen lag deutlich über der von Caco-2 Wildtyp-Zellen und stieg mit zunehmender 10E,12Z-CLA Konzentration auf bis zu 100 % der Kontrollzellen an. In Caco-2 Zellen mit überexprimiertem Rezeptor wurde die Apoptose durch die Fettsäure nur leicht induziert. Bei 200 μ M 10E,12Z-CLA lag die Apoptoserate für PPAR δ +/+ Zellen unter 50 %. Die Hypothese, dass eine verstärkte Rezeptorexpression die Zellen vor der Apoptose schützt, konnte demnach bestätigt werden. Je höher die PPAR δ Konzentration in der Zelle war, umso höhere 10E,12Z-CLA Konzentrationen mussten eingesetzt werden um die Apoptose der Krebszellen zu forcieren.

Weiterhin konnte festgehalten werden, dass CLAs in Korrelation mit der Proliferationshemmung und Differenzierungsförderung auch apoptoseinduzierende Eigenschaften haben können. Die gleichen Resultate erbrachte die Acridin Orange-Färbung. Die verwendete Positivkontrolle CTT induzierte wie gewünscht den programmierten Zelltod. Camptothecin ist ein Pflanzenalkaloid und wird zusammen mit seinen Derivaten als neue Substanz in der Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms eingesetzt. Im Hinblick auf die Kolonkarzinogenese scheinen die CLAs möglicherweise Apoptose-modulierende Effekte zu haben, die zusätzlich von der Expression des Rezeptors PPAR δ abhängig sind.

7.11.3 Vergleich der Zellproliferation und Expression von Targetgenen in nicht transformierten HCT116 Zellen

Der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor δ spielt bei der Hyperproliferation und gehemmten Apoptose von Kolonkarzinomzellen eine entscheidende Rolle. Studien zur Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Caco-2 PPAR δ überexprimierenden und reprimierenden Zellen im Vergleich zu Wildtyp Caco-2 Zellen bestätigten diese Arbeitshypothese und ebenfalls den Einfluss der Modellsubstanzen auf den Rezeptor. Weiter untermauert werden sollte diese These durch Proliferationsstudien von nicht transformierten HCT116 Zellen. Diese Zelllinie hat eine natürliche Überexpression von PPAR δ (PPAR δ +/+). Auf genetischer Ebene wurde eine Zelllinie erzeugt, die den Rezeptor homolog ausgeknockt hat (HCT116 PPAR δ -/-).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse der Rezeptorstudien in Caco-2 Wildtyp-Zellen und PPAR δ Klonen konnten anhand der HCT116 Zelllinien bestätigt werden. Beide CLA-Isomere inhibierten das Wachstum der Zellen, wobei ganz klar herausgestellt werden konnte, dass für eine halbmaximale Wachstumshemmung der HCT116 PPAR δ +/+ Zelllinie 3–3,5mal so hohe Fettsäurekonzentrationen benötigt wurden als bei HCT116 PPAR δ -/- Zellen. Die mRNA-Expression der APC- β -Catenin-TCF-4 Targets *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* korrelierten mit den Beobachtungen dieser Proliferationsstudien. *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* wurden in HCT116 PPAR δ +/+ Zellen übereinstimmend vermehrt exprimiert. Weiterhin waren für die Repression der Gene höhere CLA-Konzentrationen nötig als in vergleichbar behandelten Knockout Zellen.

Die intensiv diskutierte Rolle von PPAR δ bei der Entstehung von Kolonkarzinompolypen kann in dieser Arbeit bestätigt werden. Beim direkten Vergleich der verschiedenen Zelllinien wird der unterschiedliche Wirkungsbereich der Fettsäuren deutlich. Die Konzentrationsbereiche der Wirksubstanzen variieren von Zelllinie zu Zelllinie, sind generell aber von großem Interesse für den Menschen, da im Blut nur CLA-Level von 20-70 μ M erreicht werden [Forgerty et al. 1988].

7.12 Effekte der Heterodimerbildung von PPAR δ und RXR

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stellt der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor δ eine wichtige Zielstruktur während der Kolonkarzinogenese dar. Additive oder mögliche synergistische Effekte auf die postulierten biologischen Endpunkte sind durch die möglichen Effekte der Modellsubstanzen auf den RXR-Heterodimerpartner von PPAR δ denkbar. In der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, ob die CLA-Isomere ebenfalls mit den RXR-Heterodimerpartnern interagieren und diese aktivieren können und dadurch weitere eventuell verstärkte Effekte in den Darmkrebszellen auslösen. Dass die verzweigtkettige Phytansäure mit RXR über Heterodimerbildung mit ligandiertem RAR interagiert, konnte bereits von Elmazar und Nau (2004) gezeigt werden. Weiterhin wurde berichtet, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA am RXR binden und ihn ebenfalls aktivieren, so dass daraus geschlossen werden konnte, dass RXR ein Rezeptor für diese Fettsäuregruppe darstellt [Lengqvist et al., 2004]. Aufgrund der möglichen additiven Wirkungen von CLAs mit Liganden des RXRs ist es sinnvoll zu testen, ob CLAs mit RXRs selber interagieren und möglicherweise am RXR binden. Dies sollte für die molekulare Wirkungsweise der Fettsäuren sehr entscheidend sein.

In dieser Arbeit konnte klar dokumentiert werden, dass beide CLA-Isomere mit dem RXR-Rezeptor interagieren konnten. Der konkret für die Bindung der all-trans Retinsäure bekannte Rezeptor RAR wurde durch die CLAs nicht beeinflusst. Das deutlich potentere Minorisomer 10E,12Z-CLA aktivierte den RXR-Rezeptor um den Faktor 20 und war somit vergleichbar mit der eingesetzten Positivkontrolle von 1 μ M at-RA.

Des Weiteren wurden bereits Aktivierungsstudien von synthetischen exogenen Liganden untersucht. In vivo konnte dieses Phänomen bereits 1997 von Elmazar et al. beschrieben werden. Aus in vitro Studien ist bekannt, dass durch gleichzeitige Applikation von RAR- und RXR-Agonisten synergistische Effekte auftreten können [Lampen et al., 2001b]. Weiterhin können Fettsäuren mit Liganden der Retinoidrezeptoren in Darmzellen additive Effekte über die Interaktion mit RARs und RXRs ausüben, die dazu führen, dass Zielgene der Rezeptoren deutlich vermehrt induziert wurden [Lampen et al., 2001c].

Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, sollte das deutlich potentere Minorisomer 10E,12Z-CLA als RXR- und PPAR δ -Aktivator mit anderen synthetischen Liganden des Retinoid X Rezeptors untersucht werden. Durch Proliferationsstudien in Caco-2 Kolonkarzinomzellen sollte geklärt werden, ob die potente Wachstumsinhibition der 10E,12Z-CLA durch gleichzeitige Gabe des synthetischen RXR-Liganden CD2608 noch verstärkt werden kann. Diese Studie kann einen erheblichen Beitrag zur additiven Prävention der Kolonkarzinogenese leisten.

Die Inkubation der Caco-2 Zellen mit dem RXR-Agonisten CD2608 induzierte erstaunlicherweise konzentrationsunabhängig die Proliferation der Zellen, woraus geschlossen werden konnte, dass eine Substanz, die ausschließlich nur Ligand des RXRs ist, möglicherweise eher negativen Einfluss auf die Kolonkarzinogenese nehmen könnte. In Kombination mit steigender 10E,12Z-CLA Konzentration konnte eine Wachstumshemmung der Caco-2 Zellen begünstigt werden, die dann auch konzentrationsabhängig von CD2608 beeinflusst wurde. Im Gegensatz zu der Tatsache, dass sich teratogene Effekte in der Maus zum Teil durch gleichzeitige Gabe von RAR- und RXR-Liganden potenzierten [Elmazar et al., 1997], konnten keine synergistischen Effekte von RXR- und PPAR δ - Liganden im Bezug auf die halbmaximale Wachstumsinhibition ermittelt werden. RXR-Liganden wie Phytansäure allein, erzeugten keine teratogenen Effekte [Elmazar und Nau, 1997]. Der RXR-Ligand CD2608 konnte also nur in Kombination mit dem potenten PPAR δ -Liganden 10E,12Z-CLA eine Proliferationshemmung in Kolonkarzinomzellen auslösen. Der synthetische RXR-Ligand selber induzierte die Proliferation, wohingegen der natürliche RXR-Ligand Phytansäure in dieser Arbeit eine Wachstumshemmung begünstigte.

Für genauere Aussagen zur möglichen protektiven Heterodimerbildung von RXR und PPAR δ müssen weitere Analysen der zellulären und molekularen Mechanismen in unterschiedlichen Karzinomzellen unter Einfluss verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe erfolgen.

7.13 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Am Ende aller Untersuchungen lassen sich die Ergebnisse für die einzelnen Substanzklassen folgendermaßen zusammenfassen:

Konjugierte Linolsäureisomere

- 1 Konjugierte Linolsäureisomere interagieren in HEK293 Zellen mit dem Peroxisomalen Proliferator-aktivierten Rezeptor delta. Das Minorisomer 10E,12Z-CLA aktiviert PPAR δ am stärksten.
- 2 CLAs sind Retinoid X Rezeptor (RXR) Aktivatoren, wobei 10E,12Z-CLA das potentere Isomer in Caco-2 Zellen darstellt.
- 3 Die Hyperproliferation der Kolonkarzinomzellen Caco-2 und HT29 sowie der embryonalen Teratokarzinom-Stammzelllinie F9 wird von konjugierten Linolsäureisomeren gehemmt. Die beiden cis-trans Isomere 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA sind in ihrer halbmaximalen Wachstumsinhibition potenter als die trans-trans Fettsäure 9E,11E-CLA. Das Minorisomer 10E,12Z-CLA ist in allen Zelllinien die potenteste Modellsubstanz.
- 4 Eine Korrelation zwischen Wachstumshemmung der Kolonkarzinomzellen und molekularen Mechanismen der Krebsentstehung kann hergestellt werden. Die Targetgene der Proliferation *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* werden in HT29 Zellen von den konjugierten Linolsäureisomeren zeit- und konzentrationsabhängig inhibiert.
- 5 Promotorstudien zu *myc* und *AP-1* bestätigen den Einfluss der CLAs auf die Proliferation. In HEK293 Zellen wird die Aktivität beider Promotoren von individuellen CLA-Isomeren konzentrationsabhängig gehemmt.
- 6 Die typische Dedifferenzierung von Tumorgewebe kann durch Einfluss von konjugierten Linolsäureisomeren inhibiert werden. Das Enzym Intestinale Alkalische Phosphatase wird in der Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen durch die CLAs konzentrationsabhängig aktiviert. Weitere Promotorstudien der Differenzierungsmarker IAP, SI, CEA und iFABP bestätigen die differenzierungsfördernde Wirkung der CLAs.

- 7 Die in APC^{-/-} Karzinomzellen erhöhte Aktivität an freiem β -Catenin kann durch die CLAs in HT29 Zellen auf Gen- und Proteinebene zeit- und konzentrationsabhängig gehemmt werden. Weiterhin korreliert die Inhibition der Komponenten des β -Catenin-TCF-4 Heterodimers in Caco-2 Zellen mit der beobachteten Verminderung der Targetgene dieser Signalkaskade.
- 8 Dass der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor delta während der Proliferationsphase von Kolonkarzinomzellen eine wichtige Rolle spielt, wird anhand von vergleichenden Proliferationsprofilen von stabilen Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 und DN Klon 7 Zellen untermauert. Für die zelluläre Wachstumshemmung und die Inhibition molekularer Targetgene der Proliferation werden in Rezeptor-überexprimierenden Caco-2 Zellen höhere 10E,12Z-CLA Konzentrationen benötigt als in Caco-2 wt Zellen.
- 9 Die Differenzierung wird durch CLA-Behandlung in Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 Zellen stärker induziert als in Wildtyp-Zellen.
- 10 PPAR δ hemmt verstärkt die Apoptose in Kolonkarzinomzellen. Für eine Kondensation des Chromatins und eine Caspase-3 Induktion werden in Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 Zellen höhere Konzentrationen des Minorisomers 10E,12Z-CLA benötigt als in vergleichenden Caco-2 wt Zellen.
- 11 In nicht transformierten HCT116 Zellen wird die zelluläre Wachstumshemmung und die Inhibition von molekularen Targets der Proliferation durch konjugierte Linolsäureisomere induziert. Die Konzentrationsbereiche der CLAs sind in HCT116 -/- Zellen, die PPAR δ homolog ausgeknockt haben, signifikant niedriger als in normalen HCT116 wt Zellen, die eine natürliche Rezeptorüberexpression aufweisen.

Einfach ungesättigte Fettsäuren

- 1 Trans-Vaccensäure ist ein schwacher PPAR δ Aktivator in HEK293 Zellen.
- 2 TVA kann im Löslichkeitsbereich die Hyperproliferation in keiner der Karzinomzelllinien signifikant hemmen.
- 3 TVA kann die spezifische Alkalische Phosphatase in Caco-2 Zellen nicht signifikant erhöhen. Eine schwache Induktion des *IAP*-Promotors kann durch die Fettsäure erreicht werden.
- 4 Die TVA kann die zelluläre Proliferation in Caco-2 hPPAR δ +/+ Klon 3 Zellen möglicherweise leicht induzieren.

Verzweigt-kettige Fettsäuren

- 1 Die Phytansäure aktiviert PPAR δ in HEK293 Zellen. Ihre Affinität zur Rezeptorisoform α ist aber in der Literatur höher.
- 2 Phytansäure nimmt auf zellulärer und molekularer Ebene Einfluss auf die Proliferation von Kolonkarzinom- und F9 Zellen. *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* werden zeit- und konzentrationsabhängig inhibiert.
- 3 Eine Korrelation zwischen Wachstumshemmung der Zellen, Verminderung der Targetgenexpression und Inhibition der Promotoraktivitäten von *myc* und *AP-1* durch konzentrationsabhängige Phytansäurebehandlung kann hergestellt werden.
- 4 Das *β -catenin* Gen wird durch die Phytansäure leicht inhibiert. Auf Proteinebene kann diese Hemmung nicht gezeigt werden.
- 5 Ein Einfluss der Phytansäure auf die Differenzierung von Karzinomzellen kann nicht eindeutig geklärt werden.
- 6 Phytansäure kann im Löslichkeitsbereich das Wachstum von PPAR δ überexprimierende Caco-2 +/+ Klon 3 Zellen nicht signifikant hemmen.

Die Entstehung von Tumoren des Gastrointestinaltraktes ist eine multifunktionelle Erkrankung, die u.a. durch die Ernährung beeinflusst werden kann. Nachdem in dieser Arbeit die Ausgangshypothese bestätigt werden konnte, dass konjugierte Linolsäureisomere auf die Hyperproliferation, die Dedifferenzierung und Apoptoseinhibition von Kolonkarzinomzellen positiv Einfluss nehmen können, könnten weitere Studien zeigen, ob einzelne CLA-Isomere unterschiedlich starke Einflüsse haben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das besonders aktive Minorisomer 10E,12Z-CLA potentere Effekte auf Tumorzellen ausübt als das biologische Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Es scheint also möglich, dass individuelle Isomere in unterschiedliche spezifische molekulare Zielstrukturen der Zelle eingreifen. Zur Prävention von Kolonkrebs könnten nach weiteren Studien besonders potente Isomere der konjugierten Linolsäuren als zusätzliche Lebensmittelinhaltsstoffe in Form von Functional Food Verwendung finden. Bei einer möglichen pharmakologischen Wirkung von einzelnen CLA-Isomeren könnten diese zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Erkrankungen des Darmtraktes geeignet sein und in Zukunft als Nutraceuticals sinnvoll eingesetzt werden.

Erste Untersuchungen von CLAs an HCT116 Zelllinien konnten zeigen, dass die positiven Effekte dieser Fettsäuren nicht nur auf transformierte Krebszellen beschränkt bleiben. In Zukunft können Studien an nicht transformierten Zelllinien zur weiteren Aufklärung molekularer Signalkaskaden individueller CLA-Isomere beitragen und einen entscheidenden Sicherheitsaspekt für eine gezielte Sublimierung von Lebensmitteln mit besonders potenten Isomeren darstellen.

Die Bedeutung der Rolle des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors delta in der Kolonkarzinogenese konnte in dieser Arbeit untermauert werden. Die in Tumorzellen typische Überexpression von *PPAR δ* konnte durch die einzelnen CLA-Isomere auf Gen- und Proteinebene individuell gehemmt werden. Im Sinne der Prävention von Krebserkrankungen scheinen bestimmte Fettsäuren positiv zu wirken. Es liegt nahe, dass speziell CLAs durch Hemmung der *PPAR δ* Expression alle PPAR vermittelten Signalwege inhibieren und so eine Induktion von Kolonkrebs vermindern können.

Andere positive Effekte können von den CLAs durch Aktivierung des Retinoid X Rezeptors ausgehen. Er fungiert als Master Regulator und könnte durch CLA-Aktivierung als Heterodimerpartner für weitere Rezeptoren (THR, VDR) fungieren. Derartige Heterodimerkomplexe können so auf unterschiedliche molekulare Mechanismen Einfluss nehmen. Genauere Studien der Interaktion von CLAs mit RXRs werden in Zukunft mögliche synergistische Effekte von PPAR- und RXR-Aktivatoren aufzeigen.

Die Erkennung des toxischen Potentials der mehrfach ungesättigten konjugierten Linolsäureisomere sowie die Mechanismen der CLAs im Hinblick auf ihr Potential in der Prävention von Kolonkarzinomen waren Hauptziele dieser Arbeit. Die hier erfolgte Aufklärung von einzelnen CLA-Isomeren könnte ein sehr wichtiger Beitrag für die Sicherheitsbewertung und die zukünftige Anwendung in der Entwicklung von Functional Food sein. Die Hinweise auf mögliche protektive Wirkungsmechanismen von Modellschubstanzen können wichtige Entscheidungsgrundlagen für die Auswahl von Substanzklassen sein, die in weiteren Studien bis zur möglichen Anwendung als funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe weiterentwickelt werden könnten. Die hier analysierten Mechanismen zeigen, dass CLAs in zelluläre und molekulare Signalwege von Darmzellen eingreifen können. Dies kann zu potentiell präventiven Wirkungen, wie der Hemmung der Hyperproliferation (durch Inhibition von molekularen Markergenen wie *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun*), der Induktion der Differenzierung (durch Induktion der IAP, SI, CEA und iFABP) sowie einer Hemmung der Zelladhäsion (durch Inhibition von β -catenin) und einer Hemmung der *PPAR δ* Expression führen. Die Überexpression und Reprimierung des Peroxisomalen Proliferator-aktivierten Rezeptors delta ergaben weitere Hinweise, dass *PPAR δ* in der Regulation der Zellproliferation von Darmzellen wichtige Funktionen ausüben könnte.

8 Literaturverzeichnis

Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A., Kemler R.
beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.
EMBO J. **1997**, 16(13): 3797-3804

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.
Molecular Biology of the Cell
Verlag Garland Science New York, 4. Auflage. **2002**

Arber N., Hibshoosh H., Moss SF., Sutter T., Zhang Y., Begg M., Wang S.,
Weinstein I.B., Holt P.R.
Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal
carcinogenesis.
Gastroenterology. **1996**; 110(3): 669-674

Arber N., Doki Y., Han E.K., Sgambato A., Zhou P., Kim N.H., Delohery T.,
Klein M.G., Holt P.R., Weinstein I.B.
Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer
cells.
Cancer Res. **1997**; 57(8): 1569-1574

Atshaves B.P., Storey S.M., Petrescu A., Greenberg C.C., Lyuksyutova O.I., Smith
R. 3rd, Schroeder F.
Expression of fatty acid binding protein inhibits lipid accumulation and alters toxicity
in L cell fibroblasts.
Am J. Physiol. Cell Physiol. **2002**; 283(3): C688-703

Bacon C.L., Gallagher H., Haughey J.C., Regan C.M.
Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and
nuclear translocation of Cyclin D3 during the C6 glioma phase.
J. Neurochem. **2002**; 83: 12-19

Baltes S., Nau H., Lampen A.
All-trans retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of
intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions.
Dev. Growth Differ. **2004**; 46(6): 503-514

Banni S., Angioni E., Casu V., Melis M.P., Carta G., Corongiu F.P., Thompson H.,
Ip C.
Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk
reduction by conjugated linoleic acid.
Carcinogenesis. **1999**; 20(6): 1019-1024

Bartkova J., Lukas J., Strauss M., Bartek J.
The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas.
Int. J. Cancer. **1994**; 58(4): 568-573

Baumgart E.
Lipidstoffwechsel in Peroxisomen und dessen experimentelle Beeinflussung.
Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät, Universität Heidelberg, **1998**

Behrens J., von Kries J.P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., Birchmeier W.
Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.
Nature. **1996**; 382(6592): 638-642

Belury M.A.
Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action.
Annu. Rev. Nutr. **2002**; 22: 505-531

Belury M.A.
Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action.
J. Nutr. **2002**; 132(10): 2995-2998

Blaheta R.A., Nau H., Michaelis M., Cinatl Jr. J.
Valproate and Valproate-Analogues: Potent Tools to Fight Against Cancer.
Current Medicinal Chemistry. **2002**; 9: 1417-1433

Bodmer W.
Familial adenomatous polyposis (FAP) and its gene, APC.
Cytogenet Cell Genet. **1999**; 86(2): 99-104

Bowden C.L., Brugger A.M., Swann A.C., Calabrese J.R., Janicak P.G., Petty F., Dilsaver S.C., Davis J.M., Rush A.J., Small J.G., Garzatreveno E.S., Risch S.C., Goodnick P.J., Morris D.D.
Efficacy of divalproex vs lithium and placebo in the treatment of mania.
J. of the American Medical Association. **1994**; 12: 918-924

Braissant O., Foufelle F., Scotto C., Dauca M., Wahli W.
Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta and -gamma in the adult rat.
Endocrinology. **1996**; 137(1): 354-366

Breckenridge D.G., Shore G.C.
Regulation of apoptosis by E1A and Myc oncoproteins.
Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. **2000**; 10(3-4): 273-280

Breslow J.L.

Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases.
Nat. Med. **1997**;3(6): 600-6001

Burdick A.D., Kim D.J., Peraza M.A., Gonzalez F.J., Peters J.M.

The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epithelial cell growth and differentiation.
Cell Signal. **2006**; 18(1): 9-20

Burt R.W.

Familial association.
Adv. Exp. Med. Biol. **1999**; 470: 99-104

Butler L.M., Hewett P.J., Fitridge R.A., Cowled P.A.

Deregulation of apoptosis in colorectal carcinoma: theoretical and therapeutic implications.
Aust. N. Z. J. Surg. **1999**; 69(2): 88-94

Casciola-Rosen L., Nicholson D.W., Chong T., Rowan K.R., Thornberry N.A., Miller D.K., Rosen A.

Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death.
J. Exp. Med. **1996**; 183(5): 1957-1964

Chang W.C., Everley L.C., Pfeiffer G.R. 2nd, Cooper H.S., Barusevicius A., Clapper M.L.

Sulindac Sulfone is most effective in modulating (beta)-catenin-mediated transcription in cells with mutant APC.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **2005**; 1059: 41-55

Chew B.P., Wong T.S., Shultz T.D., Magnuson N.S.

Effects of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene in modulating lymphocyte and macrophage function.
Anticancer Res. **1997**; 17(2A): 1099-1106

Cho H.J., Kim W.K., Kim E.J., Jung K.C., Park S., Lee H.S., Tyner A.L., Park J.H.

Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **2003**; 284(6): G996-1005

Cho H.J., Kim W.K., Jung J.I., Kim E.J., Lim S.S., Kwon D.Y., Park H.J.Y.

Trans-10,cis-12, not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid decreases ErbB3 expression in HT-29 human colon cancer cells.
World J. Gastroenterol. **2005**; 11(33): 5142-5150

Chomczynski P., Sacchi N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. **1987**; 162(1): 156-159

Cook M.E., Miller C.C., Park Y., Pariza M.W.
Immune modulation by altered nutrient metabolism control of immune-induced growth depression.
Poultry Sci. **1993**; 72: 1301-1305

Corton J.C., Anderson S.P., Stauber A.
Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **2000**; 40: 491-518

Courage-Maguire C., Bacon D.L., Nau H., Regan C.M.
Correlation of anti-proliferative potential with in-vivo teratogenicity in a series of valproate analogues.
International Journal of Developmental Neuroscience. **1997**; 15: 37-43

Cruikshank W.W., Berman J.S., Theodore A.C., Bernardo J., Center D.M.
Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes.
J. Immunol. **1987**; 138(11): 3817-3823

Darmon A.J., Nicholson D.W., Bleackley R.C.
Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzym B.
Nature. **1995**; 377(6548): 446-448

De Duve C., Baudhuin P.
Peroxisomes (microbodies and related particles).
Physiol. Rev. **1966**; 46(2): 323-357

Diradourian C., Girard J., Pegorier J.P.
Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance.
Biochimie. **2005**; 87(1): 33-38

Dove W.F., Gould K.A., Luongo C., Moser A.R., Shoemaker A.R.
Emergent issues in the genetics of intestinal neoplasia.
Cancer Surv. **1995**; 25: 335-355

Dowell P., Ishmael J.E., Avram D., Peterson V.J., Nevriy D.J., Leid M.
p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha.
J. Biol. Chem. **1997**; 272(52): 33435-33443

Durgam V.R., Fernandes G.

The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system.

Cancer Lett. **1997**; 116(2): 121-130

Eisenbrand G., Schreier P.

Römpf Lexikon – Lebensmittelchemie, Thieme Verlag, Stuttgart, New York **1995**; 247

Ellinghaus P., Wolfrum C., Assmann G., Spener F., Seedorf U.

Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in sterol carrier protein 2-/sterol carrier protein x-deficient mice.

J. Biol. Chem. **1999**; 274(5): 2766-2772

Elmazar M.M., Ruhl R., Reichert U., Shroot B., Nau H.

RARalpha-mediated teratogenicity in mice is potentiated by an RXR agonist and reduced by an RAR antagonist: dissection of retinoid receptor-induced pathways.

Toxicol. Appl. Pharmacol. **1997**; 146(1): 21-28

Elmazar M.M., Nau H.

Potential of the teratogenic effects induced by coadministration of retinoic acid or phytanic acid/phytol with synthetic receptor ligands.

Arch. Toxicol. **2004**; 78(11): 660-668

Elstner E., Muller C., Koshizuka K., Williamson E.A., Park D., Asou H., Shintaku P., Said J.W., Heber D., Koeffler H.P.

Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1998**; 95(15): 8806-8811

Fearon E.R., Vogelstein B.

A genetic model for colorectal tumorigenesis.

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

Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S.

CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.

J. Biol. Chem. **1994**; 269(49): 30761-30764

Fernandez E., Chatenoud L., La Vecchia C., Negri E., Franceschi S.

Fish consumption and cancer risk.

Am. J. Clin. Nutr. **1999**; 70(1): 85-90

Fogerty A.C., Ford G.L., Svoronos D.

Octadeca-9, 11-dienoic acid in foodstuffs and in the lipids of human blood and breast milk.

Nutr. Rep. Int. **1988**; 38: 937-944

Forman B.M., Chen J., Evans R.M.

The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators.

Ann. N. Y. Acad. Sci. **1996**; 804: 266-275

Fritsche J., Steinhart H.

Analysis, occurrence and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA).

Fett/Lipid. **1998a**; 100: 190-210

Fritsche J., Steinhart H.

Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. A **1998b**; 206: 77-82

Fujioka Y., Taira T., Maeda Y., Tanaka S., Nishihara H., Iguchi-Arigo S.M., Nagashima K., Ariga H.

MM-1, a c-Myc-binding protein, is a candidate for a tumor suppressor in leukemia/lymphoma and tongue cancer.

J. Biol. Chem. **2001**; 276(48): 45137-45144

Fukumoto K., Yano Y., Virgona N., Hagiwaran H., Sato H., Senba H., Suzuki K., Asano R., Yamada K., Yano T.

Peroxisome proliferator-activated receptor delta as a molecular target to regulate lung cancer cell growth.

FEBS Lett. **2005**; 579(17): 3829-3836

Garen A., Levinthal C.

A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E.coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase.

Biochim. Biophys. Acta. **1960**; 38: 470-483

Giese K., Kingsley C., Kirshner J.R., Grosschedl R.

Assembly and function of a TCF alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions.

Genes Dev. **1995**; 9(8): 995-1008

Göttlicher M., Minucci S., Zhu P., Kramer O.H., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J.P., Lo C.F., Nervi C., Pelicci P.G., Heinzl T.

Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells.

EMBO Journal. **2001**; 24: 6969-6978

Griinari J.M., Bauman D.E.

Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminantes.

Advances in Conjugated linoleic acid research, Vol I, eds: Yurawecz M.P., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Pariza M.W., Nelson G.J.
AOCS Press, Champaign, Illinois, **1999**

Grimaldi P.A.

Fatty acid regulation of gene expression.

Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. **2001**; 4(5): 433-437

Gubler U., Hoffman B.J.

A simple and very efficient method for generating cDNA libraries.

Gene. **1983**; 25(2-3): 263-269

Ha Y.L., Grimm N.K., Pariza M.W.

Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid.

Carcinogenesis. **1987**; 8(12): 1881-1887

Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C., Stoneman V.E., Longthorne V.L., Culhane A.C., Williams G.T.

Apoptosis: molecular regulation of cell death.

Eur. J. Biochem. **1996**; 236(1): 1-26

Hall A.G.

Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis.

Eur. J. Clin. Invest. **1999**; 29(3): 238-245

Hawkins J.M., Jones W.E., Bonner F.W., Gibson G.G.

The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney.

Drug Metab. Rev. **1987**; 18(4): 441-515

He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W.

Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.

Science. **1998**; 281(5382): 1509-1512

He T.C., Chan T.A., Vogelstein B., Kinzler K.W.

PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

Cell. **1999**; 99(3): 335-345

Hengartner M.O., Horvitz H.R.

C.elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2.

Cell. **1994**; 76(4): 665-676

Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Dyck J.A., Stein R.B., Eichele G., Evans R.M., Thaller C.

9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor.

Cell. **1992**; 68(2): 397-406

Hinnebusch B.F., Meng S., Wu J.T., Archer S.Y., Hodin R.A.

The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation.

J. Nutr. **2002**; 132(5): 1012-1017

Horie S., Suga T.

Enhancement of peroxisomal beta-oxidation in the liver of rats and mice treated with valproic acid.

Biochem. Pharmacol. **1985**; 34(9): 1357-1362

Houseknecht K.L., Vanden Heuvel J.P., Moya-Camarena S.Y., Portocarrero C.P., Peck L.W., Nickel K.P., Belury M.A.

Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **1998**; 244(3): 678-682

Hruban Z., Rechcigl M.Jr.

Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry and physiology.

Int. Rev. Cytol. **1969**; Suppl 1: 1-296

Ip C., Singh M., Thompson H.J., Scimeca J.A.

Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat.

Cancer Res. **1994**; 54(5): 1212-1215

Issemann I., Green S.

Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.

Nature. **1990**; 347(6294): 645-650

Jansen G.A., Mihalik S.J., Watkins P.A., Moser H.W., Jakobs C., Denis S., Wanders R.J.

Phytanoyl-CoA hydroxylase is present in human liver, located in peroxisomes, and deficient in Zellweger syndrome: direct, unequivocal evidence for the new, revised pathway of phytanic acid alpha-oxidation in humans.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **1996**; 229(1): 205-210

Kelly G.S.

Conjugated linoleic acid: a review.

Altern. Med. Rev. **2001**; 6(4): 367-382

Kemp M.Q., Jeffy B.D., Romagnolo D.F.

Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through a p53-dependent mechanism: effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells.

J. Nutr. **2003**; 133(11): 3670-3677

Kim E.J., Kim W.Y., Kang Y.H., Ha Y.L., Bach L.A., Park J.H.Y.

Inhibition of Caco-2 cell proliferation by (n-3) fatty acids: Possible mediation by increased secretion of insulin-like growth factor binding protein-6.

Nutrition Research **2000**; 20(10): 1409-1421

Kim E.J., Holthuisen P.E., Park H.S., Ha Y.L., Jung K.C., Park J.H.

Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth.

Am. J. Physiol. Gastrointest. Physiol. **2002a**; 283(2): G357-G367

Kim E.J., Jun J.G., Park H.S., Kim S.M., Ha Y.L., Park J.H.

Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of Caco-2 colon cancer cells: possible mediation by oleamide.

Anticancer Res. **2002b**; 22(4): 2193-2197

Kim M.S., Kwon H., Lee Y.M., Baek J., Jang J., Lee S.W., Moon E., Kim H.S., Lee S.K., Chung H.Y., Kim C.W., Kim K.W.

Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes.

Nature Medicine. **2001**; 7: 437-443

Kinzler K.W., Vogelstein B.

Lessons from hereditary colorectal cancer.

Cell. **1996**; 87(2): 159-170

Kitareewan S., Burka L.T., Tomer K.B., Parker C.E., Deterding L.J., Stevens R.D., Forman B.M., Mais D.E., Heyman R.A., McMorris T., Weinberger C.

Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR.

Mol. Bio. Cell. **1996**; 7(8): 1153-1166

Kliewer S.A., Forman B.M., Blumberg B., Ong E.S., Borgmeyer U., Mangelsdorf D.J., Umesono K., Evans R.M.

Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1994**; 91(15): 7355-7359

Kliewer S.A., Sundseth S.S., Jones S.A., Brown P.J., Wisely G.B., Koble C.S., Devchand P., Wahli W., Willson T.M., Lenhard J.M., Lehmann J.M.

Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **1997**; 94(9): 4318-4323

Knutsen H.K., Olstorn H.B., Paulsen J.E., Husoy T., Goverud I.L., Loberg E.M., Kristiansen K., Alexander J.
Increased level of PPARbeta/delta and cyclin D1 in flat dysplastic ACF and adenomas in Apc(Min/+) mice.
Anticancer Res. **2005**; 25(6B): 3781-3789

Koch S.S.C., Dardashti L.J., Hebert J.J., White S.K., Croston G.E., Flatten K.S., Heyman R.A., Nadzan A.M.
Identification of the first retinoid X receptor homodimer antagonist.
J. Med. Chem. **1996**; 39(17): 3229-3234

Kohno H., Suzuki R., Yasui Y., Hosokawa M., Miyashita K., Tanaka T.
Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats.
Cancer Sci. **2004**; 95(6): 481-486

Korinek V., Barker N., Morin P.J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K.W., Vogelstein B., Clevers H.
Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma.
Science. **1997**; 275(5307): 1784-1787

Kramer O.H., Göttlicher M., Heinzl T.
Histone deacetylase as a therapeutic target.
Trends Endocrinol. Metab. **2001**; 12(7): 294-300

Kroke A., Boeing H.
Ernährung und Krebs – epidemiologische Evidenz
Referate der 5. Ernährungsfachtagung der Dt. Ges. für Ernährung 1997 in Jena: 17-26

Kubota T., Koshizuka K., Williamson E.A., Asou H., Said J.W., Holden S., Miyoshi I., Koeffler H.P.
Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo.
Cancer Res. **1998**; 58(15): 3344-3352

Kultima K., Nyström A.M., Scholz B., Gustafson A.L., Dencker L., Stigson M.
Valproic Acid Teratogenicity: A toxicogenomics approach.
Environmental Health Perspectives. **2004**; 112: 1225-1235

Lagace D.C., Nachtigal M.W.
Inhibition of Histone Deacetylase by valproic acid blocks adipogenesis.
J. Biol. Chem. **2004**; 18: 851-860

- Lampen A., Siehler S., Ellerbeck U., Göttlicher M., Nau H.
New molecular bioassays for the estimation of the teratogenic potency of valproic acid derivatives in vitro: activation of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPARdelta).
Toxicol. Appl. Pharmacol. **1999**; 160(3): 238-249
- Lampen A., Meyer S., Arnhold T., Nau H.
Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **2000**; 295(3): 979-985
- Lampen A., Carlberg C., Nau H.
Peroxisome proliferator-activated receptor delta is a specific sensor for teratogenic valproic acid derivatives.
Eur. J. Pharmacol. **2001a**; 431(1): 25-33
- Lampen A., Meyer S., Nau H.
Effects of receptor-selective retinoids on CYP26 gene expression and metabolism of all trans retinoic acid in intestinal cells.
Drug Metab. Dispos. **2001b**; 29(5): 742-747
- Lampen A., Meyer S., Nau H.
Phytanic acid and docosahexaenoic acid increase the metabolism of all-trans-retinoic acid and CYP26 gene expression in intestinal cells.
Biochim. Biophys. Acta. **2001c**; 1521(1-3): 97-106
- Lampen A., Zimnik S., Nau H.
Teratogenic phthalate esters and metabolites activate the nuclear receptors PPARs and induce differentiation of F9 cells.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **2003**; 188(1): 14-23
- Lazarow P.B., De Duve C.
A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1976**; 73(6): 2043-2046
- Lee K.N., Kritchevsky D., Pariza M.W.
Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits.
Atherosclerosis. **1994**; 108(1): 19-25
- LeMotte P.K., Keidel S., Apfel C.M.
Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand.
Eur. J. Biochem. **1996**; 236: 328-333

Lengqvist J., Mata de Urquiza A., Bergman A.C., Willson T.M., Sjovall J., Perlmann T., Griffiths W.J.

Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain.

Mol. Cell Proteomics. **2004**; 3(7): 692-703

Levin A.A., Sturzenbecker L.J., Kazmer S., Bosakowski T., Huselton C., Allenby G., Speck J., Kratzeisen C., Rosenberger M., Lovey A., et al.

9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha.

Nature. **1992**; 355(6358): 359-361

Liew C., Schut H.A., Chin S.F., Pariza M.W., Dashwood R.H.

Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms.

Carcinogenesis. **1995**; 16(12): 3037-3043

Lim H., Gupta R.A., Ma W., Paria B.C., Moller D.E., Morrow J.D., DuBois R.N., Trzaskos J.M., Dey S.K.

Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta.

Genes & Develop. **1999**; 13: 1561-1574

Liu J.R., Chen B.Q., Yang Y.M., Wang X.L., Xue Y.B., Zheng Y.M., Liu R.H.

Effect of apoptosis on gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 induced by cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid.

World J. Gastroenterol. **2002**; 8(6): 999-1004

Lock E.A., Mitchell A.M., Elcombe C.R.

Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **1989**; 29: 145-163

Luquet S., Lopez-Soriano J., Holst D., Gaudel C., Jehl-Pietri C., Fredenrich A., Grimaldi P.A.

Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) in the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome.

Biochimie. **2004**; 86(11): 833-837

Lustig B., Behrens J.

The Wnt signaling pathway and its role in tumor development.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. **2003**; 129: 199-221

Lynch H.T., Lynch J.F.

Genetics of colonic cancer.

Digestion. **1998**; 59(5): 481-92

- Ma X.T., Yu L.W., Wang S., Zhang H., Du R.Y., Cui Z.R.
Molecular mechanism of cyclooxygenase-2 inhibitor in inhibition of proliferation of colon cancer cells by modulating Stat5 signal transduction pathway.
Zhonghua Yi Xue Za Zhi. **2005**; 85(36): 2566-2569
- Maggiore M., Bologna M., Cerù M.P., Possati L., Angelucci A., Cimini A., Miglietta A., Bozzo F., Margiotta C., Muzio G., Canuto R.A.
An Overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines.
Int. J. Cancer. **2004**; 112: 909-919
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M.
The nuclear receptor superfamily: the second decade.
Cell. **1995**; 83(6): 835-839
- Mann B., Gratchev A., Riede E., Schmidt-Wolf I., Trojanek B., Moyer P., Hanski C., Buhr H.J.
beta-catenin overexpression in metastasized colorectal carcinoma – an important mechanism in progression of the disease?
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd. **1998**; 115(Suppl. I): 303-306
- Mann B., Gelos M., Siedow A., Hanski M.L., Gratchev A., Ilyas M., Bodmer W.F., Moyer M.P., Riecken E.O., Buhr H.J., Hanski C.
Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1999**; 96(4): 1603-1608
- Mariadason J.M., Rickard K.L., Barkla D.H., Augenlicht L.H., Gibson P.R.
Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation.
J. Cell Physiol. **2000**; 183(3): 347-354
- Mariadason J.M., Bordonaro M., Aslam F., Shi L., Kuraguchi M., Velcich A., Augenlicht L.H.
Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation.
Cancer Res. **2001**; 61(8): 3465-3471
- Martin M.L., Regan C.M.
The anticonvulsant valproate teratogen restricts the glial cell cycle at defined point in the mid-G1 phase.
Brain Res. **1991**; 554: 223-228
- Masters C.
Gluconeogenesis and the peroxisome.
Mol. Cell. Biochem. **1997**; 166(1-2): 159-68

Matsumoto H., Erickson R.H., Gum J.R., Yoshioka M., Gum E., Kim Y.S.
Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2.
Gastroenterology. **1990**; 98(5 Pt 1): 1199-1207

Miller A., Stanton C., Devery R.
Cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells.
Anticancer Res. **2002**; 22(6c): 3879-3887

Miura M., Zhu H., Rotello R., Hartweg E.A., Yuan J.
Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene *ced-3*.
Cell. **1993**; 75(4): 653-660

Molenaar M., van de Wetering M., Oosterwegel M., Peterson-Maduro J., Godsave S., Korinek V., Roose J., Destree O., Clevers H.
XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos.
Cell. **1996**; 86(3): 391-399

Monnig G., Wiekowski J., Kirchhof P., Stypmann J., Plenz G., Fabritz L., Bruns H.J., Eckardt L., Assmann G., Haverkamp W., Breithardt G., Seedorf U.
Phytanic acid accumulation is associated with conduction delay and sudden cardiac death in sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x deficient mice.
J. Cardiovasc. Electrophysiol. **2004**; 15(11): 1317-1318

Moore J.M., Guy R.K.
Coregulator Interactions with the Thyroid Hormone Receptor.
MCP Paper in Press. Published on Jan. 18, **2005** as Manuscript R500001-MCP200

Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W.
Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1996**; 93(15): 7950-7954

Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B., Kinzler K.W.
Acitvation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.
Science. **1997**; 275(5307): 1787-1790

Moya-Camarena S.Y., Vanden Heuvel J.P., Blanchard S.G., Leesnitzer L.A., Belury M.A.
Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha.
J. Lipid Res. **1999**; 40(8): 1426-1433

Muralidharan F.N., Muralidharan V.B.

In vitro conversion of phytol to phytanic acid in rat liver: subcellular distribution of activity and chemical characterization of intermediates using a new bromination technique.

Biochim. Biophys. Acta. **1985**; 835(1): 36-40

Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A.

Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.

Nature. **1995**; 376(6535): 37-43

O'Shea M., Stanton C., Devery R.

Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid.

Anticancer Res. **1999**; 19(3A): 1953-1959

Ochoa J.J., Farquharson A.J., Grant I., Moffat L.E., Heys S.D., Wahle K.W.

Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation : different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers.

Carcinogenesis. **2004**; 25(7): 1185-1191

Oliver W.R.Jr., Shenk J.L., Snaith M.R., Russell C.S., Plunket K.D., Bodkin N.L., Lewis M.C., Winegar D.A., Sznaidman M.L., Lambert M.H., Zu H.E., Sternbach D.D., Klierer S.A., Hansen B.C., Willson T.M.

A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **2001**; 98: 5306-5311

Ouyang N., Williams J.L., Rigas B.

NO-donating aspirin isomers downregulate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ expression in APC^{min/+} mice proportionally to their tumor inhibitory effect: Implications for the role of PPAR δ in carcinogenesis.

Carcinogenesis. **2006**; 27(2): 232-239

Oving I.M., Clevers H.

Molecular causes of colon cancer.

European Journal of Clinical Investigation. **2002**; 32: 448-457

Palombo J.D., Ganguly A., Bistrrian B.R., Menard M.P.

The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells.

Cancer Lett. **2002**; 177(2): 163-172

Pariza M.W., Park Y., Cook M.E., Albright K., Liu W.

Conjugated linoleic acid (CLA) reduces body fat.

Experimental Biology 96, Washington DC, *FASEB J.* **1996**; A560

Pariza M.W., Park Y., Cook M.E.

The biologically active isomers of conjugated linoleic acid.

Prog. Lipid Res. **2001**; 40(4): 283-298

Park B.H., Vogelstein B., Kinzler K.W.

Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **2001**; 98(5): 2598-2603

Park H.S., Ryu J.H., Ha Y.L., Park J.H.

Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA.

Br. J. Nutr. **2001**; 86(5): 549-555

Payne C.M., Bernstein H., Bernstein C., Garewal H.

Role of apoptosis in biology and pathology: resistance to apoptosis in colon carcinogenesis.

Ultrastruct. Pathol. **1995**; 19(4): 221-248

Peifer M.

Regulating cell proliferation: as easy as APC.

Science. **1996**; 272(5264): 974-975

Peifer M.

Signal transduction. Neither straight nor narrow.

Nature. **1999**; 400(6741): 213-215

Pesant M., Sueur S., Dutartre P., Tallandier M., Grimaldi P.A., Rochette L., Connat J.L.

Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) activation protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis.

Cardiovasc. Res. **2006**; 69(2): 440-449

Phiel C.J., Zhang F., Huang E.Y., Guenther M.G., Lazar M.A., Klein P.S.

Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen.

J. Biol. Chem. **2001**; 39: 36734-36741

Piazza G.A., Alberts D.S., Hixson L.J., Paranka N.S., Li H., Finn T., Borgert C., Guillen J.M., Brendel K., Gross P.H., Sperl G., Ritchie J., Burt R.W., Ellsworth L., Ahnen D.J., Pamukcu R.

Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels.

Cancer Res. **1997**, 57(14): 2909-2915

Pinto M., Robine-Leon S., Appay M., Kedinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A.
Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture.

Biol. Cell. **1983**; 47: 323-330

Ponchaut S., Draye J.P., Veitch K., Van Hoof E.

Influence of chronic administration of valproate on ultrastructure and enzyme content of peroxisomes in rat liver and kidney. Oxidation of valproate by liver peroxisomes.

Biochem. Pharmacol. **1991**; 41(10): 1419-1428

Poulos A., Sharp P., Singh H., Johnson D.W., Carey W.F., Easton C.

Formic acid is a product of the alpha-oxidation of fatty acids by human skin fibroblasts: deficiency of formic acid production in peroxisome-deficient fibroblasts.

Biochem. J. **1993**; 292 (Pt2): 457-461

Prescott S.M., White R.L.

Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2.

Cell. **1996**; 87(5): 783-786

Puka-Sundvall M., Wallin C., Gilland E., Hallin U., Wang X., Sandberg M., Karlsson J., Blomgren K., Hagberg H.

Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury.

Brain Res. Dev. Brain Res. **2000**; 125(1-2): 43-50

Quan L.T., Tewari M., O'Rourke K., Dixit V., Snipas S.J., Poirier G.G., Ray C., Pickup D.J., Salvesen G.S.

Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzym B.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1996**; 93(5): 1972-1976

Raghupathi R., Graham D.I., McIntosh T.K.

Apoptosis after traumatic brain injury.

J. Neurotrauma. **2000**;17(10): 927-938

Reed K.R., Sansom O.J., Hayes A.J., Gescher A.J., Winton D.J., Peters J.M., Clarke A.R.

PPARdelta status and Apc-mediated tumorigenesis in the mouse intestine.

Oncogene. **2004**; 23(55): 8992-8996

Ritzenthaler K.L., McGuire M.K., Falen R., Shultz T.D., Dasgupta N., McGuire M.A.

Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology.

J. Nutr. **2001**; 131(5): 1548-1554

Rosen E.D., Sarraf P., Troy A.E., Bradwin G., Moore K., Milstone D.S., Spiegelman B.M., Mortensen R.M.
PPARgamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.
Mol. Cell. **1999**; 4(4): 611-617

Santora J.E., Palmquist D.L., Roehrig K.L.
Trans-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice.
J. Nutr. **2000**; 130(2): 208-215

Schmitz J., Preiser H., Maestracci D., Ghosh B.K., Cerda J.J., Crane R.K.
Purification of the human intestinal brush border membrane.
Biochim. Biophys. Acta. **1973**; 323(1): 98-112

Seifert M.F., Watkins B.A.
Role of dietary lipid and antioxidants in bone metabolism.
Nutr. Res. **1997**; 17: 1209-1228

Shalev A., Siegrist-Kaiser C.A., Yen P.M., Wahli W., Burger A.G., Chin W.W., Meier C.A.
The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin.
Endocrinology. **1996**; 137(10): 4499-4502

Shao J, Sheng H., DuBois R.N.
Peroxisome proliferator-activated receptors modulate K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells.
Cancer Res. **2002**; 62(11): 3282-3288

Shiff S.J., Qiao L., Tsai L.L., Rigas B.
Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence and induces apoptosis in HT-29 coloncarcinoma cells.
J. Clin. Invest. **1995**; 96(1): 491-503

Shimada T., Kojima K., Yoshiura K., Hiraishi H., Terano A.
Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells.
Gut. **2002**; 50(5): 658-664

Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestell R., Ben-Ze'Ev A.
The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1999**; 96: 5522-5527

Shultz T.D., Chew B.P., Seaman W.R., Luedecke L.O.
Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene on the in vitro growth of human cancer cells.
Cancer Lett. **1992**; 63(2): 125-133

Singh I., Pahan K., Dhaunsi G.S., Lazo O., Ozand P.
Phytanic acid alpha-oxidation. Differential subcellular localization in rat and human tissues and its inhibition by nycodenz.
J. Biol. Chem. **1993**; 268(14): 9972-9979

Siezen C.L., Tijhuis M.J., Kram N.R., van Soest E.M., de Jong D.J., Fodde R., van Kranen H.J., Kampman E.
Protective effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas is modified by a polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor delta.
Pharmacogenet Genomics. **2006**; 16(1): 43-50

Smith D.R., Myint T., Goh H.S.
Over-expression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma.
Br. J. Cancer. **1993**; 68(2): 407-413

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal. Biochem. **1985**; 150(1): 76-85

Smith W.L., Borgeat P., Fitzpatrick F.A.
The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase pathways.
Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes, Hrsg: Vance, Elsevier, Amsterdam **1991**: 297-325

Sorensen K.V.
Valproate – A new drug in migraine prophylaxis.
Acta Neurologica Scandinavica. **1988**; 4: 346-348

Steinberg D., Avigan J., Mize C., Eldjarn L., Try K., Refsum S.
Conversion of U-C14-phytol to phytanic acid and its oxidation in hereditary ataxia polyneuritis formis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **1965**; 19(6): 783-789

Steinberg D., Avigan J., Mize C.E., Baxter J.H., Cammermeyer J., Fales H.M., Hight P.F.
Effects of dietary phytol and phytanic acid in animals.
J. Lipid Res. **1966**; 7(5): 684-91

Tachibana K., Kobayashi Y., Tanaka T., Tagami M., Sugiyama A., Katayama T., Ueda C., Yamasaki D., Ishimoto K., Sumitomo M., Uchiyama Y., Kohro T., Sakai J., Hamakubo T., Kodama T., Doi T.
Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms.
Nuclear Receptor. **2005**; 3: 3

Takahashi A., Earnshaw W.C.
ICE-related proteases in apoptoses.
Curr. Opin. Genet. Dev. **1996**; 6(1): 50-55

Takahashi N., Goto T., Kusudo T., Moriyama T., Kawada T.
The structures and functions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).
Nippon Rinsho. **2005**; 63(4): 557-564

Tetsu O., McCormick F.
Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.
Nature. **1999**; 398(6726): 422-426

Tontonoz P., Hu E., Graves R.A., Budavari A.I., Spiegelman B.M.
mPPARgamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer.
Genes Dev. **1994**; 8(10): 1224-1234

Trigatti B.L., Gerber G.E.
A direct role for serum albumin in the cellular uptake of long-chain fatty acids.
Biochem J. **1995**; 308: 155-159

Truitt A., McNeill G., Vanderhoek J.Y.
Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers.
Biochim. Biophys. Acta. **1999**; 1438(2): 239-246

van de Wetering M., Cavallo R., Dooijes D., van Beest M., van Es J., Loureiro J., Ypma A., Hursh D., Jones T., Bejsovec A., Peifer M., Mortin M., Clevers H.
Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF.
Cell. **1997**; 88(6): 789-799

Vosper H., Patel L., Graham T.L., Khoudoli G.A., Hill A., Macphee C.H., Pinto I., Smith S.A., Suckling K.E., Wolf C.R., Palmer C.N.
The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages.
J. Biol. Chem. **2001**; 276(47): 44258-44265

Wahle K.W., Heys S.D.
Cell signal mechanisms, conjugated linoleic acids (CLAs) and anti-tumorigenesis.
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. **2002**; 67(2-3): 183-186

Wanders R.J., van Roermund C.W., Schor D.S., ten Brink H.J., Jakobs C.
2-Hydroxyphytanic acid oxidase activity in rat and human liver and its deficiency in the Zellweger syndrome.
Biochim. Biophys. Acta. **1994**; 1227(3): 177-182

Wang D., Wang H., Shi Q., Katkuri S., Walhi W., Desvergne B., Das S.K., Dey S.K., DuBois R.N.

Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta.

Cancer Cell. **2004**; 6(3): 285-295

Werling U., Siehler S., Litfin M., Nau H., Göttlicher M.

Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta by valproic acid and its teratogenic derivatives.

Mol. Pharmacol. **2001**; 59(5): 1269-1276

Whigham L.D., Cook M.E., Atkinson R.L.

Conjugated linoleic acid: implications for human health.

Pharmacol. Res. **2000**; 42(6): 503-510

White B.C., Sullivan J.M., DeGracia D.J., O'Neil B.J., Neumar R.W., Grossman L.I., Rafols J.A., Krause G.S.

Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury.

J. Neurol. Sci. **2000**; 179(S 1-2): 1-33

Willson T.M., Wahli W.

Peroxisome proliferator-activated receptor agonists.

Curr. Opin. Chem. Biol. **1997**; 1(2): 235-241

Xu J., Thornburg T., Turner A.R., Vitolins M., Case D., Shadle J., Hinson L., Sun J., Liu W., Chang B., Adams T.S., Zheng S.L., Torti F.M.

Serum levels of phytanic acid are associated with prostate cancer risk.

Prostate. **2005**; 63(3): 209-214

Young G.P., Macrae F.A., Gibson P.R., Alexeyeff M., Whitehead R.H.

Brush border hydrolases in normal and neoplastic colonic epithelium.

J. Gastroenterol. Hepatol. **1992**; 7(4): 347-54

Yu J., Leung W.K., Chen J., Ebert M.P., Malfertheiner P., Sung J.J.

Expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta in human gastric cancer and its response to specific COX-2 inhibitor.

Cancer Lett. **2005**; 223(1): 11-17

Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H.R.

The *C.elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.

Cell. **1993**; 75(4): 641-652

Zhang T., Otevrel T., Gao Z., Ehrlich S.M., Fields J.Z., Boman B.M.

Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer.

Cancer Res. **2001**; 61(24): 8664-8667

Zhu Y., Qi C., Jain S., Rao M.S., Reddy J.K.
Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor.
J. Biol. Chem. **1997**; 272(41): 25500-25506

9 Anhänge

9.1 Abkürzungsverzeichnis

AF-1	Aktivierungs-Funktion 1 Domäne
A-FABP	adipose-type fatty acid –binding protein
AP	Aktivator-Protein
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxidisulfat
at-RA	all-trans Retinsäure
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-Cell-Lymphoma-2
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaar
BrP	Bromopalmitat
BSA	Bovines Serumalbumin
CBP	CREB-binding protein
CEA	Carcinoembryonic antigen
CED	Caenorhabditis elegans cell death gene
CLA	conjugated linoleic acid
CMV	Cytomegalovirus
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP-responsive-element-binding protein
CRT	β -catenin-TCF-regulierte Transkription
CTT	Camtothecin
DBD	DNA-binding protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidium-Bromid
FADD	Fas-associated protein with death domain

Anhänge

FKS	Fötales Kälberserum
G418	Geneticin
GMM	Glycerin-Mastermix
GSK-3 β	Glycogen-Synthase-Kinase 3 β
GTC	Guanidinthiocyanat
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HEK	human embryo kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IAP	intestinale Alkalische Phosphatase
IC ₅₀	50 % Inhibitory concentration
ICE	Interleukin-converting enzyme
I-FABP	intestinal fatty acid-binding protein
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
kDa	Kilo-Dalton
LBD	Ligand-binding protein
LEF	Lymphoid-enhancer-binding factor
Luc	Luciferase
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PARP	Poly-(Adenosindiphosphat-ribose)-Polymerase
PBP	PPAR-binding Protein
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PES	phenazine ethosulfate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPP	para-Nitrophenylphosphat
PPAR	Peroxisomen Proliferator-activated receptor
PPRE	peroxisomen proliferator response element
PUFA	polyunsaturated fatty acid
RAR	Retinoic acid Receptor
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	Retinoid X Receptor

Anhänge

SD	standard deviation (Standardabweichung des Mittelwertes)
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SEAP	secreted alkaline phosphatase
SI	Saccharase-Isomaltase
TCF	T-cell factor
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TFA	trans fatty acid
THR	Thyroidhormon-Rezeptor
TK	Tymidinkinase
TR β	Thyroidhormon-Rezeptor beta
TVA	trans vaccenic acid
U	Units
UAS	hefespezifische Erkennungssequenz für den GAL4 Faktor
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VPA	Valproic acid
wt	Wildtyp

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2-1:** Strukturformeln der Trans-Vaccensäure und einiger Linolsäureisomere.
- Abbildung 2-2:** Physiologische Effekte von konjugierten Linolsäuren.
- Abbildung 2-3:** Biosyntheseweg von Phytansäure.
- Abbildung 2-4:** Phytansäureabbau durch α -Oxidation.
- Abbildung 2-5:** Schematische Struktur eines Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors.
- Abbildung 2-6:** Schematische Darstellung des APC- β -Catenin-TCF-4 Signalweges im normalen Darmepithel. Die Wirkung des β -Catenins wird durch dessen Abbau in den Proteasomen beendet.
- Abbildung 2-7:** Schematische Darstellung der Signalkaskade in Kolonkarzinomzellen mit einem mutierten APC-Protein.
- Abbildung 2-8:** Hypothese der möglichen Rolle von PPAR δ während der Kolonkarzinogenese.
- Abbildung 2-9:** Signaltransduktion der Apoptose am Beispiel von Caspase-3.
- Abbildung 2-10:** Schema der Apoptoseprozesse einer Zelle und ihre messbaren Veränderungen.
- Abbildung 5-1:** Formel zur Berechnung von DNA-Konzentrationen.
- Abbildung 5-2:** Formel zur Berechnung von RNA-Konzentrationen.
- Abbildung 6-1:** PPAR δ -Aktivierung durch Trans-Vaccensäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion des Rezeptors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-2:** Proliferationsverlauf verschiedener Zelllinien nach konzentrationsabhängiger Trans-Vaccensäure Behandlung. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatennachse ist die Proliferation der Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-3:** Promotoraktivität der IAP in Caco-2 Zellen nach Induktion mit Trans-Vaccensäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-4:** Proliferationsverlauf der Caco-2 Klone nach Behandlung mit Trans-Vaccensäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=4). Auf der Ordinatennachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-5:** Vergleich der PPAR δ -Aktivierung durch die beiden CLA-Isomere 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf den Ordinatennachse ist jeweils die Induktion des Rezeptors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-6:** RAR- und RXR-Aktivierung durch die CLAs. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf den Ordinatennachsen ist jeweils die Induktion des Rezeptors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-7:** Zeitabhängige PPAR δ mRNA-Expression in unbehandelten HT29 Zellen. Gezeigt ist die densitometrische Auswertung eines repräsentativen Gels von drei unabhängigen Experimenten.

- Abbildung 6-8:** mRNA-Expression von PPAR δ in HT29 Zellen nach Behandlung mit den Isomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Auf den Ordinatenachsen ist die Aktivierung des Gens nach Normalisierung mit β -actin relativ zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-9:** Proliferation der Zelllinien unter Einfluss des Hauptisomers 9Z,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100% Wachstum bezeichnet. Alle Werte ab 82 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar (P<0,05).
- Abbildung 6-10:** Proliferation der Zelllinien unter Einfluss des Minorisomers 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100% Wachstum bezeichnet. Alle Werte stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar (P<0,05).
- Abbildung 6-11:** Proliferation der Zelllinien unter Einfluss des Minorisomers 9E,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100% Wachstum bezeichnet. Alle Werte ab 84 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar (P<0,05).
- Abbildung 6-12:** Zeitabhängige mRNA-Expression von Proliferationsgenen in unbehandelten HT29 Zellen. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-13:** Effekte von steigender 9Z,11E-CLA Konzentration auf die *c-myc* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt ist die Auswertung repräsentativer Gele. Auf der Ordinatenachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-14:** Effekte von 10E,12Z-CLA in steigender Konzentration auf die *c-myc* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt ist die Auswertung repräsentativer Gele. Auf der Ordinatenachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-15:** Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR Produkte. Konzentrationsabhängiger Effekt von 9Z,11E-CLA auf die *cyclin D1* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von drei unabhängigen Experimenten. Aufgrund der hohen Probenzahl wurden immer zwei Gele parallel gefahren (Nr. 1-12 und Nr. 13-20).
- Abbildung 6-16:** Effekt von 10E,12Z-CLA auf die *cyclin D1* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt ist die densitometrische Auswertung eines repräsentativen Gels. Auf der Ordinatenachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-17:** Zeitlicher Verlauf der *c-jun* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Behandlung mit steigender 9Z,11E-CLA Konzentration. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Auf der Ordinatenachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-18:** Konzentrationsabhängiger Effekt von 10E,12Z-CLA auf die *c-jun* mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Auf der Ordinatenachse ist jeweils die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

- Abbildung 6-19:** Aktivierung der 5' flankierenden Region des *c-myc* Gens in HEK293 Zellen nach konzentrationsabhängiger Behandlung mit den Isomeren 9Z,11E-CLA und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=9). Auf der Ordinatennachse ist die Promotoraktivität relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-20:** AP-1 Aktivität in HEK293 Zellen nach konzentrationsabhängiger CLA-Behandlung. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Aktivität relativ zur Kontrolle bzw. in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-21:** Spezifische Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase in Caco-2 Zellen nach konzentrationsabhängiger Induktion mit den Linolsäureisomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=4). Auf der Ordinatennachse ist die Bildung von p-Nitrophenol pro mg Protein angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-22:** Promotoraktivität der IAP in Caco-2 Zellen nach konzentrationsabhängiger Induktion mit den CLA-Isomeren 9Z,11E- und 10E,12-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-23:** Vergleich der CEA-Aktivität (Carcinoembryonic antigen) in Caco-2 Zellen nach Induktion mit 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion der CEA-Aktivität relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-24:** Aktivität der SI (Saccharase-Isomaltase) in Caco-2 Zellen nach Induktion mit den Isomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion der SI-Aktivität relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-25:** Aktivität des iFABP in Caco-2 Zellen nach Induktion mit den Isomeren 9Z,11E- und 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion der iFABP-Aktivität relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-26:** Vergleich der Reporterkonstrukte pTOPFLASH und pFOPFLASH nach Transfektion in Caco-2 wt Zellen. Auf der Ordinatennachse ist die Induktion der Zellen nach konzentrationsabhängiger 10E,12Z-CLA Behandlung relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-27:** Reporterassays der mit 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen nach Transfektion der beiden β -catenin Konstrukte im Vergleich. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=6). Auf der Ordinatennachse ist jeweils die Induktion der Zellen relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-28:** Unterschiede in der Aktivierung des TCF-4 wt Plasmides im Gegensatz zum mutierten TCF-4 Reporterkonstrukt in mit 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen nach Transfektion. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=6). Auf der Ordinatennachse ist jeweils die Induktion der Zellen relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-29:** Inhibierung der Luciferaseaktivität durch das Minorisomer 10E,12Z-CLA nach Triple-Transfektion von pTOPFLASH mit den beiden wt bzw. mutierten β -Catenin und TCF-4 Konstrukten. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Inhibition relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

- Abbildung 6-30:** Inhibierung durch das Minorisomer 10E,12Z-CLA nach Triple-Transfektion von pTOPFLASH mit dem Wildtyp- β -Catenin und dem mutierten TCF-4 Konstrukt. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenachse ist die Inhibition relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * ($P<0,05$) angegeben.
- Abbildung 6-31:** Zeitabhängige β -catenin mRNA-Expression in unbehandelten HT29 Zellen. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-32:** Konzentrationsabhängiger Effekt von 9Z,11E-CLA auf die β -catenin mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von n=3. Aufgrund der hohen Probenzahl wurden immer zwei Gele parallel gefahren (1-12 und 13-20).
- Abbildung 6-33:** Konzentrationsabhängiger Effekt von 10E,12Z-CLA auf die β -catenin mRNA-Expression in HT29 Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von n=3. Aufgrund der hohen Probenzahl wurden immer zwei Gele parallel gefahren (1-12 und 13-20).
- Abbildung 6-34:** Vergleich der zeitabhängige β -catenin mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Behandlung mit je 100 μ M der CLA-Isomere. Gezeigt ist die Auswertung repräsentativer Gele. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-35:** Zeit- und konzentrationsabhängiger β -Catenin Abbau durch das Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von n=3. Der β -Catenin Abbau zeigt sich durch die zunehmend auftretenden Banden.
- Abbildung 6-36:** Zeit- und konzentrationsabhängiger β -Catenin Abbau durch das Minorisomer 10E,12Z-CLA. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von n=3. Aufgrund der Probenanzahl wurden immer zwei Blots parallel durchgeführt (Nr. 1–8 und Nr. 9–12).
- Abbildung 6-37:** PPRE-Aktivität der Caco-2 Klone. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=4). Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Rezeptors der Klone relativ zu Caco-2 wt Kontrollzellen angegeben.
- Abbildung 6-38:** Vergleich der Proteinexpression von PPAR δ in verschiedenen Zelllinien. Gezeigt sind repräsentative Western Blots.
- Abbildung 6-39:** Vergleich der Proteinexpression von PPAR δ in Caco-2 Klonen. Gezeigt sind repräsentative Western Blots von n=3.
- Abbildung 6-40:** Proliferation der Caco-2 Klone +/+ Klon 3 und DN Klon 7 nach Behandlung mit dem Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Alle Werte ab 79 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar ($P<0,05$).
- Abbildung 6-41:** Proliferation der Caco-2 Klone +/+ Klon 3 und DN Klon 7 nach Behandlung mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Alle Werte ab 64 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar ($P<0,05$).
- Abbildung 6-42:** Vergleich der mRNA-Expression von Markergenen der Proliferation in unbehandelten Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ Klonen (\blacktriangledown +/+ Klon 3, \blacksquare DN Klon 7, \bullet wt). Gezeigt sind jeweils die densitometrischen Auswertungen repräsentativer Gele von drei unabhängigen Experimenten. Auf den Ordinatenachsen ist die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

- Abbildung 6-43:** Zeitabhängiger Vergleich der Genexpressionsprofile von mit 5 μM 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ Klonen (\blacktriangledown +/+ Klon 3, \blacksquare DN Klon 7, \bullet wt). Gezeigt sind jeweils die densitometrischen Auswertungen repräsentativer Gele von drei unabhängigen Experimenten. Auf den Ordinatenachsen ist die Ratio des Gens im Bezug auf β -actin relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-44:** Promotoraktivität der *IAP* in PPAR δ -überexprimierenden (+/+ Klon 3) und -reprimierenden (DN Klon 7) Caco-2 Klonen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nach Induktion mit dem Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-45:** Promotoraktivität der *IAP* in PPAR δ -überexprimierenden (+/+ Klon 3) und -reprimierenden (DN Klon 7) Caco-2 Klonen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nach Induktion mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-46:** Zeitabhängiger Vergleich der β -catenin mRNA-Expression von unbehandelten und mit 5 μM 10E,12Z-CLA behandelten Caco-2 wt Zellen und PPAR δ Klonen (\blacktriangledown +/+ Klon 3, \blacksquare DN Klon 7, \bullet wt). Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-47:** Caspase-3 Aktivität in Caco-2 wt Zellen und PPAR δ -überexprimierenden sowie -reprimierenden Klonen (+/+ Klon 3, DN Klon 7) nach Induktion mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA. Auf der Ordinatenachse ist die Steigerung der Caspase-3 Aktivität relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-48:** Acridine Orange-Färbung von Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ -überexprimierenden und -reprimierenden Caco-2 Klonen (+/+ Klon 3, DN Klon 7) nach Induktion mit 100 μM 10E,12Z-CLA. Dargestellt ist jeweils ein signifikantes Foto der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Als Positivkontrolle wurden 50 μM Camptothecin eingesetzt.
- Abbildung 6-49:** Auswertung der Acridine Orange-Färbung von Caco-2 wt Zellen und hPPAR δ -überexprimierenden und -reprimierenden Caco-2 Klonen (+/+ Klon 3, DN Klon 7) nach Induktion mit 100 μM 10E,12Z-CLA und 50 μM Camptothecin (pos. Kontrolle). Auf der Ordinatenachse ist die Apoptoserate in % der Gesamtzellzahl angegeben.
- Abbildung 6-50:** Proliferation der HCT116 Zelllinien nach Behandlung mit dem Hauptisomer 9Z,11E-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-51:** Proliferation der HCT116 Zelllinien nach Behandlung mit dem Minorisomer 10E,12Z-CLA. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-52:** Zeitabhängige mRNA-Expression der Proliferationsgene *c-myc*, *cyclin D1* und *c-jun* in unbehandelten HCT116 PPAR δ +/+ Zellen (\bullet) im Vergleich zu HCT116 PPAR δ -/- Zellen (\circ). Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-53:** Zeitabhängige Expression von *c-myc* in mit 10E,12Z-CLA behandelten HCT116 PPAR δ +/+ Zellen im Vergleich zu HCT116 PPAR δ -/- Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von drei unabhängigen Experimenten.
- Abbildung 6-54:** Zeitabhängige Expression von *cyclin D1* in mit 10E,12Z-CLA behandelten HCT116 PPAR δ +/+ Zellen im Vergleich zu HCT116 PPAR δ -/- Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von drei unabhängigen Experimenten.

Anhänge

- Abbildung 6-55:** Zeitabhängige Expression von *c-jun* in mit 10E,12Z-CLA behandelten HCT116 PPAR δ +/+ Zellen im Vergleich zu HCT116 PPAR δ -/- Zellen. Gezeigt sind repräsentative Gele von drei unabhängigen Experimenten.
- Abbildung 6-56:** PPAR δ -Aktivierung durch Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion des Rezeptors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-57:** Zeit- und konzentrationsabhängige PPAR δ mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels von drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinatennachse ist die Induktion des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-58:** Zeit- und konzentrationsabhängige hPPAR δ Proteinexpression in HT29 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Gezeigt sind repräsentative Western Blots von drei unabhängigen Experimenten. Aufgrund der Probenanzahl wurden immer drei Blots parallel durchgeführt (Nr. 1-6, 7-11 und 12-16).
- Abbildung 6-59:** Proliferation der Zelllinien unter Einfluss der Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatennachse ist die Proliferation der behandelten Zellen relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben. Die unbehandelte Kontrolle wurde als 100 % Wachstum bezeichnet. Alle Werte ab 72 % stellen eine signifikante Proliferationshemmung dar (P<0,05).
- Abbildung 6-60:** Zeitabhängige Expression von Proliferationsgenen in unbehandelten HT29 Zellen. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.
- Abbildung 6-61:** *c-myc* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf der Ordinatennachse ist die Ratio des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-62:** *cyclin D1* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf der Ordinatennachse ist die Ratio des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-63:** *c-jun* mRNA-Expression in HT29 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels. Für jede Variable wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf der Ordinatennachse ist die Ratio des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-64:** Messung der *myc*- und *AP-1* Aktivität in HEK293 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=9). Auf der Ordinatennachse ist die Promotoraktivität relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-65:** Spez. Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase in Caco-2 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=4). Auf der Ordinatennachse ist die Bildung von p-Nitrophenol pro mg Protein angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-66:** Promotoraktivität der *IAP* in Caco-2 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion des Promotors relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-67:** *CEA*-Aktivität (Carcinoembryonic antigen) und Aktivität der *SI* (Saccharase-Isomaltase) in Caco-2 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatennachse ist die Induktion der *CEA*- bzw. *SI*-Aktivität relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.

- Abbildung 6-68:** Aktivität des *iFABP* in Caco-2 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=3). Auf der Ordinatenachse ist die Steigung der *iFABP*-Aktivität relativ zur Kontrolle angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Abbildung 6-69:** Zeit- und konzentrationsabhängige β -*catenin* Expression in HT29 Zellen nach Induktion mit Phytansäure. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Gels von drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinatenachse ist die Induktion des Gens relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben.
- Abbildung 6-70:** Zeit- und konzentrationsabhängige β -Catenin Proteinexpression in HT29 Zellen nach Phytansäurebehandlung. Gezeigt sind repräsentative Western Blots von drei unabhängigen Experimenten. Aufgrund der Probenanzahl wurden immer drei Blots parallel durchgeführt (Nr. 1–6, 7-11 und 12–16).
- Abbildung 6-71:** Proliferationsverlauf der Caco-2 Klone nach Behandlung mit Phytansäure. Alle Messpunkte sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Auf der Ordinatenachse ist die Proliferation der behandelten Klone relativ zu ihrer jeweiligen Kontrolle angegeben.

9.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 4-1:** Liste der verwendeten Substanzen und jeweilige Bezugsquellen.
- Tabelle 4-2:** Plasmidnamen und Klonierung.
- Tabelle 4-3:** Primersequenzen für die semi-quantitativen PCR-Analysen.
- Tabelle 5-1:** Zelllinien, ihr Herkunftsorgan und spezifische Kulturbedingungen.
- Tabelle 5-2:** Verwendete Plasmide, eingesetzte Konzentrationen und die versuchsabhängige Behandlungsdauer der Zellen.
- Tabelle 5-3:** Eingesetzte Zellzahlen der diversen Zelllinien im Proliferationsassay.
- Tabelle 5-4:** Pipettierschema für die Bestimmung der Caspase-3 Aktivität.
- Tabelle 5-5:** Gesamtübersicht aller untersuchten Gene.
- Tabelle 5-6:** Komponenten des Trenn- und Sammelgels. Die Angaben beziehen sich auf das Volumen für 2 Mini-Gele.
- Tabelle 5-7:** Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen.
- Tabelle 6-1:** Konzentrationsabhängige Zytotoxizität der verwendeten Testsubstanzen am Beispiel der Caco-2 wt Zelllinie. Die lebenden Zellen wurden in % der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Alle Messungen sind der Mittelwert \pm SD (n=8). Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Tabelle 6-2:** IC₅₀ Werte der Proliferationsinhibition von Caco-2, HT29 und F9 Zellen. Alle Werte wurden mit dem Programm Table Curve 2D, Version 5.01 berechnet.
- Tabelle 6-3:** Synergistische Effekte auf das Wachstum der Zellen nach kombinierter Behandlung mit CD2608 und 10E,12Z-CLA. Die Proliferation der Caco-2 Zellen wurde in % der jeweiligen Kontrolle dargestellt. Alle Messungen sind der Mittelwert \pm SD (n=5). Signifikante Unterschiede sind mit * (P<0,05) angegeben.
- Tabelle 6-4:** IC₅₀ Werte der Proliferationshemmung von Caco-2 Klonen.
- Tabelle 6-5:** IC₅₀ Werte der Proliferationshemmung von HCT116 Zelllinien. Alle Werte wurden mit dem Programm Table Curve 2D, Version 5.01 berechnet.
- Tabelle 7-1:** Zusammenfassung der PPAR δ -Aktivierung durch 200 μ M der Modellsubstanzen.
- Tabelle 7-2:** Antiproliferative Effekte der Modellsubstanzen auf verschiedene Zelllinien ausgedrückt als IC₅₀ Werte.

9.4 Lebenslauf

Name Maren Leifheit

Geburtsdatum 20.03.1976

Geburtsort Einbeck, Niedersachsen

Familienstand ledig

04/2002 – 05/2006 **Wissenschaftliche Angestellte** (Doktorandin) am Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Prof. Dr. Dr. h.c. H. Nau)

12/2001 – 01/2002 **Wissenschaftliche Hilfskraft** am Institut für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

10/1995 – 12/2001 **Studium der Biologie** (Diplom) an der Universität Hannover

12/2001 **Abschluss: Diplom-Biologin**

04/2001 – 12/2001 **Diplomandin** am Institut für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Prof. Dr. H. Y. Naim)

10/2000 - 03/2001 **Wissenschaftliche Hilfskraft** am Institut für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

04/2000 - 05/2000 **Großpraktikum der Biochemie** am Institut für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

04/1999 **Abschluss: Biologie-Vordiplom**

08/1988 – 06/1995 Gymnasium Humboldtschule Hannover

06/1995 **Abschluss: Abitur**

9.5 Publikationsliste

Lampen A., Leifheit M., Voss J., Nau H.

Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: Effects on proliferation, differentiation and gene expression.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids

Biochim Biophys Acta. **2005**; 1735(1):30-40

Lampen A., Voss J., Leifheit M., Eikel D., Nau H.

Impact of PPAR δ expression on the effects of conjugated linoleic acids (CLAs) on intestinal cell proliferation.

14th VETPHARM **2004** in Zürich, 16.-17. September

Lampen A., Voss J., Leifheit M., Eikel D., Nau H.

Molecular and cellular effects of conjugated linoleic acids (CLAs) in enterocytes: Effects on proliferation, differentiation and gene expression.

55. Mosbacher Kolloquium **2004**; How nutrients influence gene activity. 1.-4. April

Lampen A., Voss J., Leifheit M., Nau H.

Molecular and cellular effects of conjugated linoleic acids (CLA's) and branched fatty acids in enterocytes: Effects on proliferation, differentiation and gene expression.

DGPT 44th Spring Meeting, Mainz; 18.–20. März 2003

Archives of Pharmacology **2004**; 369: A573

9.6 Erklärung zur wissenschaftlichen Arbeit

Ich erkläre hiermit, dass ich die hier vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Präventive Effekte von konjugierten Linolsäureisomeren
und verzweigtkettigen Fettsäuren**

Die Rolle der nuklearen Rezeptoren PPAR in der Kolonkarzinogenese

selbstständig verfasst habe und keine anderen als die genannten und zitierten Hilfsmittel und Quellen herangezogen habe. Die zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen und Personen sind vollständig und namentlich angegeben.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist. Sie ist in diesem Sinne auch noch nicht anderweitig veröffentlicht worden. Bisherige Teilveröffentlichungen sind gemäß den Bestimmungen der Ordnung für die Promotion zur Doktorin der Naturwissenschaften an der Universität Hannover erfolgt und unter 9.5 vollständig aufgeführt.

Ort, Datum

Unterschrift

9.7 Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Alfonso D. Lampen, der mir das vorliegende Thema anvertraut hat und mir bei der Bearbeitung dieses Projektes jederzeit wohlwollend und konstruktiv zur Seite stand. Durch seine wissenschaftliche Kompetenz und Förderung hatte ich die Gelegenheit fachlich von ihm zu lernen und mich persönlich weiterzuentwickeln.

Herrn Prof. Dr. Walter H. Müller und Herrn Prof. Dr. Bernd Otto danke ich für die Bereitschaft zur Durchführung des Promotionsverfahrens an der Universität Hannover, für die Begutachtung dieser Arbeit und das gezeigte Interesse an dem Thema. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Nau danke ich für die Bereitschaft zur Anfertigung dieser Dissertation am Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung Lebensmitteltoxikologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank Frau Anke Lingenauber für die großzügige und zeitintensive Hilfsbereitschaft bei diversen Versuchsdurchführungen. Frau Nicole Brauer-Dewor danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der RT-PCRs sowie Herrn Uwe Grunenberg für die vorherige Etablierung der Western Blots.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gebührt Dank für die Finanzierung der Arbeit im Rahmen des Verbundprojektes „Lipide und Phytosterole in der Ernährung“.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für die permanente Unterstützung während meines gesamten Studiums und für die Überwindung von Schwierigkeiten aller Art, besonders zum Ende dieser Dissertation.